



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

NATÁLIA MIYAGUTI ANGELO DA SILVA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM  
LEUCINA E/OU ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA-3  
NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS DO CÂNCER NA PROLE DE  
RATAS

MODULATORY EFFECTS OF NUTRITIONAL  
SUPPLEMENTATION WITH LEUCINE AND/OR OMEGA-3  
POLYUNSATURATED FATTY ACID ON DAMAGES EFFECTS  
OF CANCER IN ADULT- OFFSPRING RATS

CAMPINAS  
2019

**NATÁLIA MIYAGUTI ANGELO DA SILVA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA E/OU ÁCIDO  
GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS DO  
CÂNCER NA PROLE DE RATAS**

**MODULATORY EFFECTS OF NUTRITIONAL SUPPLEMENTATION WITH  
LEUCINE AND/OR OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID ON  
DAMAGES EFFECTS OF CANCER IN ADULT- OFFSPRING RATS**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como parte  
dos requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Doutora em BIOLOGIA FUNCIONAL E  
MOLECULAR, na Área de FISILOGIA*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the  
University of Campinas in partial fulfillment of the  
requirements for the degree of Doctor in  
Functional and Molecular Biology in the area of  
Physiology.*

*Orientadora: MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES*

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NATÁLIA  
MIYAGUTI ANGELO DA SILVA, E ORIENTADA PELA  
PROFa. DRa. MARIA CRISTINA CINTRA GOMES  
MARCONDES

**CAMPINAS  
2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M699e Miyaguti, Natália Angelo da Silva, 1989-  
Efeitos da suplementação nutricional com leucina e/ou ácido graxo poli-insaturado ômega-3 na modulação dos efeitos do câncer na prole de ratas / Natália Miyaguti Angelo da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. Caquexia. 3. Leucina. 4. Ácidos graxos Ômega-3. 5. Suplementação alimentar. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Modulatory effects of nutritional supplementation with leucine and / or omega-3 polyunsaturated fatty acid on damages effects of cancer in adult-offspring rats

**Palavras-chave em inglês:**

Cancer  
Cachexia  
Leucine  
Omega-3 fatty acids  
Supplementary feeding

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]  
Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio  
Murilo Vieira Geraldo  
Marília Cerqueira Leite Seelaender  
Miguel Soares Conceição

**Data de defesa:** 21-05-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4446-7924>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8679345168980598>

Campinas, 21 de maio de 2019.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Titulares**

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes (Orientadora)

Profa. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Prof. Dr. Miguel Soares Conceição

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## DEDICATÓRIA

Para a minha pequena Maria e todas outras  
incríveis Marias que já cruzaram minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a minha família por todo apoio prestado durante esses 4 anos de doutorado, pois sem este, eu não teria chegado até aqui. Em especial, obrigada Maria por toda sua sensibilidade mesmo sendo tão pequena, ter você como filha me motiva diariamente a seguir em frente, obrigada por existir na minha vida. Boy, obrigada pela busca em ser um bom companheiro e pela capacidade de entender a importância da pesquisa na minha vida, eu sei que isso não se encontra em qualquer lugar.

Também gostaria de agradecer minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina, por todo apoio, sugestões e críticas para que neste tempo de doutorado eu pudesse crescer profissionalmente e pessoalmente. Sempre a admirei e agradeço pela confiança dada a minha capacidade de realizar meus projetos.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do Laboratório de Nutrição e Câncer. Sarah, obrigada por toda amizade e companheirismo e, mais uma vez, por confiar na minha orientação, espero muito que tenha te ajudado. Bia e Gabi, agradeço por terem feito parte deste projeto e terem confiado em meu trabalho. Rogério e Carla pelos almoços e conversas, ajudando a tornar mais leve os problemas e dificuldades do percurso da pós-graduação. E a todos os demais membros do laboratório que ainda estão ou já passaram por lá, meu muito obrigado por me ajudarem a ser a profissional que sou hoje.

Agradeço imensamente ao apoio dos meus amigos. O percurso não foi nada fácil nestes quatro anos, sem vocês eu não poderia ter sido tão forte em continuar lutando e desenvolvendo meu trabalho. Obrigada em especial aos amigos: Pelanza (<3), Lívias, Lara, Kim e Pedro.

No quesito amparo emocional, muito importante na vida de um pós-graduando, além da minha família e amigos, gostaria de agradecer as psicólogas que me acompanharam neste tempo: Catarina Padovani, Maria Lídia, Caroline e Simone, e aos plantões e serviço oferecido pelo Serviço de Assistência Psicológica e Psiquiátrica ao Estudante (SAPPE/UNICAMP). Como mãe, agradeço a todos da Escola Infantil Integração, por cuidarem tão bem da minha filha, pois sem a confiança de que minha filha fica em boas mãos não seria possível trabalhar de maneira produtiva.

A todos outros que também contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, muito obrigada! E agradeço por final a Fapesp (2017/02739-4), CNPq e CAPES ( “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”).

## RESUMO

**Introdução:** O câncer é a segunda causa de morte mundial e a caquexia é uma síndrome que pode afetar até 85% dos pacientes com câncer avançado e uma vez instalada, ainda não há meio de reverter-la, sendo então importante o estudo de estratégias de prevenção. A modificação da dieta materna, pelo uso de suplementação nutricional, pode alterar a programação metabólica da prole a partir de modificações que podem perdurar até a vida adulta, sendo uma abordagem a ser estudada a fim de prevenir o aparecimento de doenças na prole, como o câncer. Estudos já mostraram que o aminoácido de cadeia ramificada leucina e óleos de peixes ricos em ácido graxo poli-insaturado ômega-3 podem atuar como moduladores de alterações fisiopatológicas relacionadas à caquexia. **Objetivos:** Tendo em vista os efeitos benéficos dessas suplementações administradas terapeuticamente, o presente estudo avaliou se esses nutrientes, quando administrados maternalmente durante os períodos de gestação e lactação, também poderiam trazer benefícios à prole na vida adulta quanto às respostas frente à caquexia. **Métodos:** Ratas Wistar grávidas receberam dieta Controle; dieta Leucina (3% de L-leucina) e/ou dieta Ômega-3 (contendo óleo de peixe rico em ômega-3) durante os períodos de gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Após desmame, a prole de machos passou a receber dieta controle até a vida adulta (120 dias), momento em que ocorreu a inoculação do tumor de Walker 256 nos grupos portadores de tumor. Para experimento de análise de sobrevivência, após a inoculação tumoral, os animais foram acompanhados até o final da vida. Em novo experimento, os animais foram acompanhados por 21 dias de crescimento tumoral; após este momento foi realizada a eutanásia, incluindo os grupos sem tumor, dos quais foram coletadas amostras de soro, tecido muscular e hepático para análises de atividade enzimática, parâmetros bioquímicos, *Western Blot*, metabolômica por  $^1\text{H}$  RMN, medição de síntese e degradação proteica muscular. **Resultados:** Foram encontradas modificações quanto aos efeitos da caquexia sobre a função hepática, minimizando o estresse oxidativo no fígado da prole cujas mães receberam suplementação nutricional com leucina e/ou ômega-3 e, também, melhora na sobrevivência desses animais. O metabolismo da prole cujas mães receberam dieta suplementada com leucina foi alterado, havendo menor perda de massa magra, pela melhora do balanço entre síntese e degradação proteica muscular, com modificações relacionadas à via da mTOR e vias proteolíticas. **Conclusão:** A menor espoliação do hospedeiro frente à caquexia oriunda do efeito da suplementação materna com leucina e/ou óleo de peixe rico em ômega-3 foi pela primeira vez demonstrada nesse estudo, abrindo perspectivas para caracterização das alterações epigenéticas que culminaram nestes benefícios na vida adulta da prole.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is the second cause of death, and cachexia is a syndrome that can affect up to 85% of advanced cancer patients. Since cachexia still remains irreversible it is important new strategies of prevention. Modifications in the maternal diet with the use of nutritional supplementation can alter the metabolic programming of the offspring until adulthood, being an innovative approach to prevent diseases in the offspring adulthood, such as cancer. Studies have shown that the branched-chain amino acid leucine and the fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acid, when used as therapeutic approach, can act as modulators of pathophysiological changes related to cachexia. **Objectives:** Considering the beneficial effects of these supplements, the present study evaluated whether these nutrients, when administered only during gestation and lactation, could also beneficiate the offspring in the adulthood in responses to the cachexia syndrome. **Methods:** Pregnant Wistar rats received Control diet; Leucine-rich diet (3% L-leucine) and/or Omega-3 diet (containing fish oil rich in omega-3) during gestation (21 days) and lactation (21 days). After weaning, the males offspring began to receive the Control diet until adulthood (120 days), when was inoculated the Walker 256 tumour. For the survival experiment, after tumour inoculation, the animals were followed until natural death. In a new experiment, the animals were followed for 21 days of tumour growth and then euthanized, including the Control groups, from which serum, muscle and liver tissue samples were collected for enzyme activity analysis, biochemical and molecular parameters,  $^1\text{H}$  RMN metabolomics, muscle protein synthesis and degradation analysis. **Results:** Modifications related to the effects of tumour on liver function were found, which minimised the oxidative stress in liver of adult offspring rats whose mothers received nutritional supplementation with leucine and/or omega-3, which reflected in improvements of survival in these animals. The metabolism from the offspring maternally supplemented with leucine was altered, minimising the muscle mass loss, with an improved balance between muscle protein synthesis and degradation. **Conclusion:** The maternally supplemented adult offspring animals had a better response against cachexia damages; thus, the present study first demonstrated this innovative approach against cancer cachexia effects in muscle and liver tissues of adult offspring tumour-bearing rats. Further studies are now ongoing to better understand the epigenetic mechanism involved in these benefits.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**4 – EBP** – eIF4E *Binding Protein*

**AIN** – *American Institute of Nutrition*

**ALT** – alanina aminotransferase

**AP** – fosfatase alcalina

**AST** – aspartato aminotransferase

**ATP** – adenosina trifosfato

**DHA** – ácido docosaheptaenoico

**EPA** – ácido eicosapentaenoico

**GGT** – gamma glutamil transferase

**GSH** – glutathione redutase

**GST** – glutathione S-transferase

**IL-1** – interleucina 1

**IL-6** – interleucina 6

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer

**MDA** – malondialdeído

**mTOR** – *mechanistic target of rapamycin*

**NMR** – *nuclear magnetic resonance*

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PCA** – *principal component analysis*

**PIF** – fator indutor de proteólise

**PLS – DA** – *partial least squares-discriminant analysis*

**PQN** – *probabilistic quotient normalisation*

**RMN** – ressonância magnética nuclear

**S6K1** – p70S6 *Kinase*

**SOD** – superóxido dismutase

**TCA** – *tricarboxylic acid cycle*

**TNF** – fator de necrose tumoral

**UKCCC** – *United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS E MOTIVAÇÕES.....	11
1.2. REVISÃO DA LITERATURA .....	12
1.2.1. Câncer Caquexia .....	12
1.2.2. Prevenção do Câncer- Influência da Nutrição Materna .....	14
1.2.3. Leucina e Ômega-3 e a Caquexia. ....	16
1.2.4. Novas perspectivas: Metabolômica .....	18
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>19</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3. CAPÍTULO I .....</b>	<b>21</b>
<b>Suplementação nutricional materna com óleo de peixe e/ou leucina melhora a função hepática, defesas antioxidantes e minimiza o índice de caquexia da prole de ratos adultos portadores do tumor de Walker-256.....</b>	
<b>21</b>	
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>37</b>
<b>Administração de dieta materna rica em leucina minimizou a perda de massa muscular na prole de ratos adultos portadores de tumor através da melhora do balanço entre a síntese e degradação proteica muscular. ....</b>	
<b>37</b>	
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>55</b>
<b>Análise metabolômica de soro, por <sup>1</sup>H NMR, mostrou as alterações nas respostas metabólicas influenciadas pela suplementação nutricional materna com leucina na prole de ratos adultos portadores de tumor.....</b>	
<b>55</b>	
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>66</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. ASPECTOS GERAIS E MOTIVAÇÕES**

O câncer é uma das principais causas de morte mundial, sendo considerado um grande problema de saúde pública. As causas do câncer, por sua vez, são em sua grande maioria desencadeadas por fatores ambientais e/ou patológicos, que transformam a maquinaria celular promovendo efeitos deletérios com o seu desenvolvimento desordenado. Assim, durante a evolução tumoral, as alterações metabólicas que ocorrem em pacientes com câncer podem levar ao prejuízo de sua qualidade de vida. Dentre esses efeitos tem-se a caquexia, uma síndrome que ocorre em até 85% dos pacientes com câncer em estágio avançado, caracterizada pela perda involuntária de peso devido à grande espoliação de massa muscular esquelética, prejudicando não apenas a qualidade de vida, mas também a redução das respostas aos tratamentos clínicos convencionais, culminando na redução da sobrevida.

Entre os períodos do ciclo de vida de um indivíduo, a gestação é um dos períodos mais decisivos e singulares, propagando-se para o período da lactação. O suprimento nutricional ao feto e posteriormente ao lactente depende da nutrição e das reservas maternas, proporcionando o adequado desenvolvimento embrionário/ fetal e o crescimento do neonato até o desmame, garantindo o crescimento e desenvolvimento para a maturação fisiológica na vida adulta. Assim, durante o período gestacional, através de nutrientes da dieta capazes de ultrapassar a placenta e chegar ao feto e durante o período da amamentação por meio de nutrientes que possam interferir na composição do leite materno, a nutrição materna pode alterar a programação metabólica da prole, através de alterações epigenéticas, modulando o risco do desenvolvimento de doenças no futuro.

Atualmente, os órgãos de saúde têm investido na orientação quanto à prevenção de doenças e uma das principais abordagens é a adoção de uma nutrição adequada. Assim, levando-se em consideração a importância de alternativas de prevenção do câncer, e por consequência minimizar o estabelecimento e prejuízos da caquexia, e que a modulação da dieta materna pode trazer benefícios que prevalecem até a vida adulta da prole, este trabalho avaliou a suplementação nutricional materna com dois nutrientes amplamente estudados em sua atuação na modulação da caquexia: o aminoácido de cadeia ramificada leucina e o óleo de peixe rico em ácido graxo poli-insaturado ômega-3, como estratégia a ser adotada na melhora dos efeitos deletérios desta condição na prole adulta.

## 1.2. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1. Câncer Caquexia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte mundial, sendo responsável por 9.6 milhões de mortes em 2018, correspondendo a uma em cada seis mortes no mundo (OMS, 2019). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer, para o biênio de 2018-2019, foi estimada a ocorrência de 600 mil novos casos a cada ano, havendo assim a necessidade de comprometimento em fortalecer a vigilância desta doença, focando em ações de controle e prevenção (INCA, 2017).

Associada ao câncer, podendo afetar a maioria dos pacientes (até 85% em certos tipos tumorais) e sendo responsável direta por até 22% das mortes destes, a caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada pela progressiva perda de massa muscular esquelética, acompanhada ou não de perda de massa gorda e por inflamação sistêmica (CID R64 (“CID10 Codigo Internacional de Doencas”, 2019)). Uma vez a caquexia instalada, ainda não há meios de revertê-la (ARGILÉS et al., 2014, 2017; BARACOS et al., 2018; FEARON et al., 2011a). Associadas a estas características, sintomas como a astenia, anorexia, anemia e fadiga fazem parte deste quadro e resultam na diminuição da qualidade de vida, da resposta ao tratamento anti-cancer e também da sobrevida (ARGILÉS et al., 2017; FEARON et al., 2011b; FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006).

Típica da caquexia, a perda de massa muscular esquelética deriva do balanço proteico e energético negativo, combinado à diminuição da ingesta e metabolismo disfuncional (FEARON et al., 2011a). Assim, dada a influência do balanço proteico negativo na progressão da doença, os processos de síntese e degradação muscular são amplamente estudados nesta condição (ARGILÉS et al., 2017; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; MUELLER et al., 2015; TISDALE, 2009). A via da mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) tem sido um importante ponto de estudo para entender o controle da síntese proteica muscular em situações de câncer-caquexia, uma vez que esta pode ser alterada nesta condição (SAXTON; SABATINI, 2017; TISDALE, 2003). O mTOR Complexo 1 (mTORC1), que apresenta como unidade catalítica a proteína serina/treonina quinase mTOR, é responsável pela promoção da síntese proteica através da fosforilação de dois efetores *downstream* da via: p70S6 Kinase (S6K1) e eIF4E Binding Protein (4EBP), relacionados a ativação da tradução de mRNA. Já a regulação *upstream* desta via é dada principalmente pelo estado nutricional do organismo, a partir de moléculas sinalizadoras deste, como fatores de crescimento, hormônios e aminoácidos. Por exemplo, um aumento sérico de aminoácidos, em

resposta a ingestão de proteínas ou pelo uso de suplementos, como a leucina, pode ativar esta via, através da ativação da mTOR (SAXTON; SABATINI, 2017).

A degradação muscular também é um dos pontos chave de estudos em relação ao *turnover* proteico, sendo as vias ubiquitina-proteassomo, autofágico-lisossomal, cálcio-dependente e caspases as responsáveis por este processo (ARGILÉS et al., 2014; PORPORATO, 2016). Em relação ao sistema ubiquitina-proteassomo, as proteínas que são marcadas para degradação pelas ubiquitinases, são reconhecidas pelo proteassomo que fará a clivagem dessas proteínas. O proteassomo possui duas subunidades 19S regulatórias e a subunidade 20S responsável pela clivagem das proteínas. A degradação proteica no músculo esquelético, relacionada ao proteassomo, pode ser medida através da atividade da enzima com atividade semelhante à quimiotripsina (*chymotrypsin-like*), que possui atividade catalítica dominante no núcleo da subunidade 20S do proteassomo, assim, sendo estudada em relação à proteólise em casos de câncer caquexia (ELEY; TISDALE, 2007; GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002; SMITH; MUKERJI; TISDALE, 2005). Em modelos animais, durante a caquexia, o sistema ubiquitina-proteassomo está regulado positivamente no músculo esquelético, levando ao aumento do processo de degradação muscular. Apesar do sistema ubiquitina-proteassomo ter o papel principal na proteólise no músculo esquelético em modelos experimentais de caquexia, ainda hoje são limitadas as evidências da ação deste mecanismo em pacientes (MILAN et al., 2015). Em humanos, também há evidências da influência dos outros sistemas influenciando na degradação muscular (COSTELLI et al., 2005; TISDALE, 2003). As calpaínas, enzimas relacionadas à proteólise cálcio-dependente, e caspases são apontadas no envolvimento inicial na quebra das miofibrilas, apesar de seu envolvimento na proteólise muscular, poucos estudos com humanos foram conduzidos até o momento relacionando esses sistemas à caquexia (COSTELLI et al., 2005). Já o sistema autofágico-lisossomal atua na degradação proteica do músculo esquelético a partir da proteólise que ocorre nos lisossomos pela ação das enzimas chamadas catepsinas. No músculo de pacientes com câncer há indícios de uma alta expressão de proteínas relacionadas à autofagia, mostrando seu papel nesta condição (OP DEN KAMP et al., 2013; STEPHENS et al., 2010; TARDIF et al., 2013).

Além da importância da modificação do balanço proteico, a caquexia, sendo uma síndrome multifatorial, também pode alterar diversas vias metabólicas, levando à dificuldade em manter a homeostase do organismo, afetando a função de diversos tecidos e órgãos, podendo ser denominada também como uma síndrome de múltiplos órgãos (ARGILÉS et al., 2014, 2018). Além das alterações no músculo, o tecido adiposo, intestino, cérebro, coração e

fígado também são impactados. Essas alterações em diversos órgãos e tecidos levam conjuntamente à perda de massa magra e agravamento do quadro caquético. Portanto, uma das abordagens atuais nos estudos em câncer-caquexia envolve melhor entender os mecanismos de intercomunicação entre os órgãos e tecidos que culminam em alterações fisiopatológicas que contribuem para a progressão da doença (ARGILÉS et al., 2014, 2018).

Dada a importância do fígado como um regulador do metabolismo, participando na síntese de glicose, pela neoglicogênese; de colesterol; proteína C reativa; fatores de coagulação e sendo caracterizado por alta taxa metabólica, seu estudo na situação de câncer-caquexia é de extrema importância para melhor entender a instalação e progressão da doença (PORPORATO, 2016). Em situações de câncer caquexia, a massa hepática pode aumentar com a progressão da doença, indicando o envolvimento deste órgão nesta condição (TISDALE, 2002a). O fígado utiliza o fluxo de aminoácidos proveniente da espoliação proteica do músculo esquelético para a produção de proteínas de fase aguda, principalmente a proteína C reativa (CRP) (ARGILÉS et al., 2014). A alta produção de CRP está relacionada diretamente ao quadro inflamatório do câncer e progressão da doença (ARGILÉS et al., 2018). Durante o desenvolvimento tumoral, sabe-se que as mitocôndrias dos hepatócitos possuem sua eficiência de fosforilação oxidativa reduzida e que o fígado participa intensamente da gliconeogênese a partir de lactato e aminoácidos provenientes do músculo (PEYTA et al., 2015). As células neoplásicas utilizam preferencialmente a glicose como substrato energético e a convertem em lactato pela glicólise. O fígado fica responsável pela reconversão deste lactato novamente em glicose, pelo Ciclo de Cori, com gasto de seis moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de glicose convertida, sendo considerado um ciclo fútil, de alta demanda energética (TISDALE, 2009). Essas situações, em conjunto, contribuem para um alto gasto energético, levando ao desbalanço na produção de energia do organismo (PORPORATO, 2016). Portanto, sendo o fígado um órgão extremamente recrutado em situações de câncer, mais estudos são necessários para entender os mecanismos que relacionam a progressão da doença e as alterações de suas funções.

### ***1.2.2. Prevenção do Câncer- Influência da Nutrição Materna***

Segundo a OMS, 30% a 50% dos cânceres poderiam ser prevenidos (OMS, 2019), sendo a dieta, nutrição e atividade física um dos principais fatores para prevenção do risco em desenvolver esta doença (MAYNE; PLAYDON; ROCK, 2016). Além disso, são altos os impactos do câncer na qualidade de vida do paciente, associado a altos custos médicos. Assim, estratégias que foquem na prevenção do câncer devem ser estudadas e valorizadas

(BAIL; MENESES; DEMARK-WAHNEFRIED, 2016; FLABOURARIS; KARIKAS, 2016; MAYNE; PLAYDON; ROCK, 2016; OMS, 2019).

Levando em consideração a importância da dieta e adoção de hábitos nutricionais saudáveis, muitos estudos têm enfoque na nutrição, pela adoção de modificações nos padrões alimentares do indivíduo, como uma forma de prevenir o câncer (BAIL; MENESES; DEMARK-WAHNEFRIED, 2016; THANIKACHALAM et al., 2019; VERMA, 2013). Uma das vertentes deste tipo de estudo, em voga atualmente, é a influência da nutrição materna como preventiva e/ou moduladora ao desenvolvimento de doenças na vida adulta de sua prole (ALBERT et al., 2015; HOLLAND et al., 2016; HSU et al., 2018; JACK-ROBERTS et al., 2017).

A nutriepigenética estuda os nutrientes presentes na dieta que podem alterar diversas vias metabólicas, através da modulação da expressão gênica. Tais modificações não mudam a estrutura do DNA e podem ocorrer a partir da metilação do DNA, modificações de histonas e RNA de interferência (SAPIENZA; ISSA, 2016; TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013). Esse mecanismo, em termos de nutrição materna, pode ocorrer durante a gestação, uma vez que a dieta é o principal fator que interfere no desenvolvimento e plasticidade fetal, e também no período de amamentação. Assim, os nutrientes capazes de ultrapassar a barreira placentária e que também influenciam a composição do leite materno, podem alterar a programação metabólica da prole, via alterações epigenéticas, podendo modular seu risco em desenvolver doenças no futuro (GLUCKMAN et al., 2005; MATHIAS et al., 2014).

Em casos de câncer-caquexia, intervenções nutricionais associadas a novos fármacos já têm sido aplicadas em pacientes a fim de melhorar os efeitos deletérios desta condição e pesquisas ainda buscam uma reversão do quadro caquético desses pacientes através do uso desta combinação (ARGILÉS et al., 2017; BUSQUETS et al., 2018; TISDALE, 2001). Paralelamente, um novo ramo de estudo tem enfoque também na prevenção desta condição de caquexia a partir da nutrição materna. Assim, alguns dos nutrientes escolhidos para o estudo como o aminoácido leucina e o ácido graxo poli-insaturado ômega-3, usualmente, já apresentam efeito positivo na modulação da caquexia a partir da administração terapêutica e têm pelo menos parte de seu mecanismo de ação definido (CURI; FERNANDES, 2008; HARLE et al., 2005; IAGHER et al., 2013; MABASA et al., 2013; PETERS et al., 2011). Desse modo, para tal abordagem, são utilizados modelos experimentais de animais e tumores já estabelecidos para a indução da caquexia, e no presente estudo os efeitos desses nutrientes foram observados na prole adulta descendente de mães alimentadas com dietas suplementadas.

### 1.2.3. Leucina e Ômega-3 e a Caquexia.

A leucina faz parte do conjunto de aminoácidos de cadeia ramificada cujas propriedades de estímulo da síntese proteica muscular vêm sendo exploradas, uma vez que esse aminoácido atua não apenas como elemento essencial para síntese de novas proteínas, mas também como uma molécula sinalizadora para iniciação da síntese proteica. (DANIEL A COLUMBUS, MARTA L FIOROTTO, 2015; DUAN et al., 2016). Estudos mostram que a leucina, independente dos outros aminoácidos deste conjunto (isoleucina e valina), é capaz de realizar essa estimulação com melhores resultados (KIMBALL; JEFFERSON, 2006). A administração da leucina, na forma de suplementação, em voluntários jovens e idosos, já mostrou resultados positivos na estimulação da síntese proteica (KATSANOS, 2006; KOOPMAN et al., 2006). Além disso, em pacientes com câncer, esta suplementação após realização de cirurgia levou a melhores respostas e menor tempo de recuperação hospitalar e quando avaliados pacientes em quimioterapia, houve menor morbidade, melhora no status nutricional e na qualidade de vida (CHOUDRY et al., 2006; POON et al., 2004; YUCHUNG et al., 1997). Assim, em situações de câncer associada à espoliação muscular, a administração da leucina pode ser uma importante aliada como coadjuvante ao tratamento clínico convencional no controle da doença e recuperação do paciente.

A leucina apresenta seu efeito anabólico no músculo esquelético, sendo sua concentração intracelular detectada por sensores de aminoácidos nas células (HAN et al., 2012), levando a ativação da mTORC1, que regula a fosforilação e ativação dos seus efetores *downstream*, modulando os passos de iniciação e/ou alongação da tradução (DUAN et al., 2016). Em ratos Wistar portadores do tumor de Walker-256, modelo experimental de indução de caquexia, a suplementação nutricional com leucina já se mostrou eficaz no estímulo da síntese proteica, modulando o complexo mTORC1 e seus efetores (VENTRUCCHI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2007, 2004). Além dos efeitos na estimulação da síntese proteica em situações de câncer- caquexia, estudos mostram que a suplementação com leucina também pode modular a degradação proteica muscular, pela alteração das vias de degradação muscular: ubiquitina-proteassomo; cálcio-dependente e autofágico-lissossomal (GIRÓN et al., 2015; HOLEČEK, 2017; SMITH; MUKERJI; TISDALE, 2005). Apesar do mecanismo de ação completo da leucina sobre a degradação proteica precise ainda de maior esclarecimentos, seus efeitos sobre o balanço proteico colocam esse aminoácido como uma peça importante na terapia coadjuvante a ser estudada na caquexia.

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 também são estudados amplamente em sua relação ao tratamento e prevenção do câncer. Os tipos mais comuns são o ácido



eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), encontrados em óleos e gorduras derivados de animais marinhos, principalmente peixes de águas frias (NABAVI et al., 2015). Sendo considerado de administração segura, o ômega-3 já vem sendo utilizado na terapia contra o câncer associado aos tratamentos convencionais, apresentando resultados positivos (DE AGUIAR PASTORE SILVA; EMILIA DE SOUZA FABRE; WAITZBERG, 2015). Em estudos em pacientes com câncer, a suplementação com EPA mostrou boa tolerância, sendo eficaz no aumento da massa magra, apetite e qualidade de vida nos pacientes com câncer em estágio avançado (BARBER, 2001; CALDER et al., 2018; DAMSBO-SVENDSEN; RØNSHOLDT; LAURITZEN, 2013; MURPHY et al., 2011; WEED et al., 2011). Além do estímulo para as respostas anti-inflamatórias, em modelos animais com caquexia, o consumo de óleo de peixe, rico em ômega-3, mostrou-se eficaz na diminuição da ubiquitinação de proteínas musculares, regulação negativa da expressão gênica de componentes da via ubiquitina-proteassomo e estímulo para o aumento da expressão da miosina, levando a resultados positivos quanto a prolongar sobrevida, promoção do ganho de peso, diminuição do volume tumoral e melhor ingesta (BECK; SMITH; TISDALE, 1991; D.H. et al., 2002; FEARON et al., 2006; MURPHY et al., 2011; PIZATO et al., 2005; WHITEHOUSE et al., 2001).

Para o estudo da influência da suplementação materna com leucina e ômega-3 na prole, deve-se considerar a capacidade destes nutrientes em ultrapassar a barreira placentária e também estarem presentes no leite materno. Os aminoácidos podem atravessar a barreira placentária ativamente e seu transporte depende de múltiplos fatores como a localização e atividade de seus transportadores e a concentração plasmática de aminoácidos maternos. Inclusive, em estudo com ratas prenhes suplementadas com leucina já foi relatado um aumento sérico deste aminoácido em seus fetos (REGNAULT; VRIJER; BATTAGLIA, 2002; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013). Os aminoácidos de cadeia ramificada estão presentes no leite materno e, com destaque para leucina, possuem papel na sinalização da estimulação da via da mTOR na prole (MELNIK, 2015). Já em relação ao ômega-3, a disponibilidade de triacilgliceróis e, principalmente ácidos graxos essenciais, pode ser influenciada pela dieta materna, sendo dependente da seletividade placentária, relacionada à seus receptores de membrana, para serem disponibilizados à circulação fetal, no caso da composição do leite materno já é sabido que a concentração de EPA e DHA também pode ser diretamente correlacionada com os hábitos nutricionais maternos (MENNITTI et al., 2015).

#### ***1.2.4. Novas perspectivas: Metabolômica***

A metabolômica é uma das ferramentas da atual era das “ômicas”, sendo capaz de prover a detecção, identificação e quantificação de diversos metabólitos de baixo peso molecular envolvidos no metabolismo de um organismo em determinadas condições fisiológicas (KOSMIDES, 2014). A metabolômica baseada na ressonância magnética nuclear (RMN) é um método capaz de identificar variações de metabólitos através da análise tanto tecidual quanto de biofluidos. O uso de biofluidos, como urina e soro, para análise metabolômica baseada em RMN é de extrema importância uma vez que sua obtenção ocorre de forma não invasiva e reflete variação do metabolismo do organismo (GISKEØDEGÅRD et al., 2018). Em casos de câncer, uma vez que se tem um metabolismo alterado pela evolução tumoral, a metabolômica em biofluidos permite a caracterização do risco, detecção, caracterização e prognóstico, da doença pela identificação de mudanças no perfil metabólico (CALA et al., 2018; DER-TOROSSIEN et al., 2013a; EISNER et al., 2011; QUANJUN et al., 2015).

Na caquexia associada ao câncer, o balanço energético negativo derivado de uma inflamação sistêmica, aumento do gasto energético e ingesta diminuída estão associados a um metabolismo anormal. Essas alterações metabólicas em que há predominância no anabolismo levando a perda das reservas energéticas (ARGILÉS et al., 2014; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012) podem ser estudadas através da metabolômica. Essa ferramenta pode permitir um melhor entendimento da condição através da identificação dos mecanismos regulatórios da doença, pelo encontro de biomarcadores de progressão e intervenções que possam auxiliar em sua modulação (CALA et al., 2018; DER-TOROSSIEN et al., 2013b; GALLAGHER et al., 2016; QUANJUN et al., 2015). O encontro de biomarcadores tem sido estudado, principalmente, para uso na detecção precoce da doença e estadiamento da caquexia. Outro desafio é o estudo de intervenções na modulação dos parâmetros relacionados à caquexia na tentativa de encontrar as alterações metabólicas que culminaram nos resultados encontrados (DER-TOROSSIEN et al., 2013a; QUANJUN et al., 2015; QUANJUN et al., 2013). Estudo em metabolômica conduzido por Der-Torossian e colaboradores, com camundongos portadores de tumor apresentou alterações no metabolismo da glicose, lipídeos e nas vias catabólicas que envolvem os aminoácidos de cadeia ramificada em amostras de soro (DER-TOROSSIEN et al., 2013a). Em outro estudo, com o uso da intervenção com Composto A, não foram encontradas diferenças no metabolismo do músculo gastrocnêmio desses animais, quando comparados ao controle (DER-TOROSSIEN et al., 2013b). Já em estudo com terapia com formoterol em camundongos portadores do carcinoma C26 foi

encontrada sua capacidade em regular o desbalanço da glicólise, do ciclo do ácido tricarboxílico e do metabolismo de lipídeos e aminoácidos, permitindo que futuramente a ação deste composto possa ser estudada focando nestes mecanismos (QUANJUN et al., 2013).

Assim, a metabolômica pode ser uma importante ferramenta para entender melhor as vias metabólicas alteradas na caquexia, sendo que, principalmente em estudos experimentais, o uso de amostras de soro permite o reconhecimento das alterações globais no metabolismo produzidas por intervenções preventivas ou terapêuticas nesta condição.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Investigar se a suplementação nutricional materna com leucina e/ou óleo de peixe rico em ômega-3 melhora a resposta dos ratos descendentes adultos ao estado de caquexia induzido pelo tumor de Walker-256.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**CAPÍTULO I - Hipótese:** A suplementação nutricional materna com leucina e/ou óleo de peixe rico em ômega-3 melhora as respostas hepáticas e modula a sobrevida na prole adulta portadora de tumor.

- Investigar o tempo de sobrevida da prole adulta suplementada maternalmente com leucina e/ou óleo de peixe, após indução da caquexia;
- Determinação da função hepática pela avaliação das enzimas: gamma glutamil transferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST);
- Avaliação das enzimas antioxidantes no tecido hepático: glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GSH), catalase, superóxido dismutase (SOD) e malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica.

**CAPÍTULO II - Hipótese:** O aminoácido de cadeia ramificada leucina, quando administrado via dieta materna, pode modular a perda de massa magra, na prole adulta, decorrente da caquexia, através da modulação dos processos de síntese e degradação muscular.

Músculo gastrocnêmio:

- Avaliação do processo de síntese e degradação muscular;

- Avaliação de proteínas-chave da via da mTOR: PI3K, mTOR, p70S6K e 4-EBP1.
- Avaliação das subunidades do proteassomo: 11S, 19S, 20S;
- Avaliação de enzimas relacionadas à degradação muscular: calpaina, catepsina H e *chymotrypsin-like*

**CAPÍTULO III - Hipótese:** A dieta rica em leucina quando administrada através de uma suplementação materna, nos períodos de gestação e lactação, pode promover alterações no perfil metabólico sérico da prole..

- Avaliar os espectros gerados por técnica de  $^1\text{H}$  NMR, utilizando análises quimiométricas para identificação de possíveis diferenças espectrais entre os grupos com e sem intervenção na dieta materna, buscando os metabólitos chaves responsáveis por tais diferenças.
- Relacionar as diferenças encontradas entre os grupos suplementados ou não maternalmente com suas respostas frente ao crescimento tumoral.

### 3. CAPÍTULO I

**Suplementação nutricional materna com óleo de peixe e/ou leucina melhora a função hepática, defesas antioxidantes e minimiza o índice de caquexia da prole de ratos adultos portadores do tumor de Walker-256.**

*(“Maternal nutritional supplementation with fish oil and/or leucine improves hepatic function and antioxidant defenses, and minimizes cachexia indexes in walker-256 tumor-bearing rats offspring.”)*

**Versão final publicada na revista: *Nutrition Research* (2018):**

Miyaguti NADS, de Oliveira SCP, Gomes-Marcondes MCC. *Maternal nutritional supplementation with fish oil and/or leucine improves hepatic function and antioxidant defenses, and minimizes cachexia indexes in Walker-256 tumor-bearing rats offspring*. Nutr Res. 2018 Mar;51:29-39. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.003. Epub 2017 Dec 28.

#### **Resumo do Capítulo I:**

Introdução: Câncer é a segunda principal causa de morte mundial e até 20% dessas mortes são causadas pela caquexia, uma síndrome multifatorial, principalmente associada às neoplasias em estado avançado, caracterizada por intenso catabolismo. O estado disfuncional do metabolismo do hospedeiro caquético impacta o fígado drasticamente nesta condição. O aminoácido leucina e o ácido graxo poli-insaturado ômega-3 são nutrientes estudados no tratamento do câncer-caquexia uma vez que podem modular o catabolismo e melhorar a resposta antioxidante. Neste estudo, verificamos se dieta materna suplementada com esses nutrientes também auxilia na atenuação do quadro de caquexia com enfoque nas respostas hepáticas em ratos adultos portadores do tumor. Foi avaliado se os esquemas nutricionais com esses nutrientes melhoram o índice de caquexia, sobrevida e também a função e resposta ao estresse oxidativo no tecido hepático.

Métodos: Foram administradas as dietas controle, rica em leucina; rica em ômega-3 e rica em leucina e ômega-3 às ratas Wistar durante a gestação e período de amamentação. Após o desmame, a prole de machos das mães que receberam as dietas indicadas, foram submetidos à dieta controle até a vida adulta (120 dias de idade). Após esse período, os ratos adultos foram distribuídos em cinco grupos de acordo com a dieta materna e implante tumoral (n=4-6 por grupo): C, grupo controle; W, grupo portador de tumor; WL, grupo portador de

tumor com dieta materna rica em leucina; WO, grupo portador de tumor com dieta materna rica em ômega-3; WLO, grupo portador de tumor com dieta materna rica em leucina e ômega-3. Após 21 dias de evolução tumoral, os animais foram eutanasiados e foram coletados soro e tecido hepático para avaliação da função hepática (enzimas GGT, AST, ALT) e estresse oxidativo (SOD, catalase, GST, GSH, MDA). Também foi realizado novo experimento para avaliação de sobrevida dos animais.

Resultados: O grupo portador de tumor (W) apresentou maior índice de caquexia, já nos grupos suplementados maternalmente com dieta rica em ômega-3 (WO e WLO) este índice foi significativamente menor. Em relação à sobrevida, o grupo W apresentou o menor tempo de sobrevida, enquanto os grupos suplementados maternalmente apresentaram um aumento desta. A função hepática foi preservada nos grupos suplementados maternalmente, já no grupo W houve aumento na razão AST/ALT. Quanto ao estresse oxidativo avaliado no tecido hepático, no grupo W houve aumento na atividade enzimática da fosfatase alcalina e da SOD somado ao aumento do conteúdo do MDA, mostrando maior dano nestes grupos, enquanto nos grupos suplementados maternalmente, não houve diferença entre as atividades das enzimas antioxidantes e no conteúdo de MDA.

Conclusões: As dietas suplementadas com leucina e/ou ômega-3 modificaram as respostas antioxidantes no tecido hepático e melhoraram a sobrevida e o índice de caquexia da prole adulta portadora de tumor, sendo assim, a suplementação nutricional materna pode ser uma estratégia positiva contra os futuros efeitos deletérios da caquexia.

## **1. Introdução**

Atualmente o câncer é a segunda principal causa de morte mundial, sendo responsável pela morte de cerca de 8.8 milhões de pessoas por ano (OMS, 2019). Associada ao câncer, a caquexia causa a morte de até 20% dos pacientes e é caracterizada por alterações metabólicas e elevado processo inflamatório, que levam a um intenso catabolismo e reduzido anabolismo (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012). Este estado de metabolismo desregulado é marcado pela depleção de carboidratos, lipídeos e principalmente proteínas, levando à intensa perda de peso e dano de tecido estrutural (FEARON et al., 2011b; TISDALE, 2002b). Na caquexia, o fígado, que é um órgão essencial na homeostase metabólica, apresenta seu metabolismo alterado com a supressão do potencial cetogênico e adaptação ao processo de *starving*, sendo também afetado pela supressão do sistema imune e aumento do estresse oxidativo (DEMINICE et al., 2016; FLINT; FEARON; JANOWITZ,

2017). Esses fatores contribuem para a sobrecarga dos órgãos e consequente redução da sobrevida do paciente (MURPHY et al., 2011; PAPPALARDO; ALMEIDA; RAVASCO, 2015).

Uma vez instalada, a caquexia ainda é irreversível e estratégias de modulação da composição da dieta, como o uso da suplementação nutricional, já tem sido uma importante estratégia terapêutica (BALDWIN, 2015; BALSTAD et al., 2014; FEARON et al., 2011b). A prevenção de diversas doenças, incluindo o câncer, pode começar desde a gestação, pela alteração da dieta materna modulando o metabolismo da prole e refletindo nas respostas às doenças na vida adulta (REMELY et al., 2015; TAMASHIRO; MORAN, 2010), uma vez que a composição nutricional da dieta materna é o fator ambiental mais importante na modulação do metabolismo da prole, pela alteração da expressão gênica, sendo que os períodos de gestação e lactação são críticos e determinantes para possível modulação do desenvolvimento fetal (MATHIAS et al., 2014).

A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada com propriedades de alteração da sinalização celular para o aumento da síntese proteica e redução da proteólise muscular, sendo utilizado amplamente como suplemento nutricional (ANTHONY et al., 2001; GARLICK PETER, 2005; SALOMÃO et al., 2010). O ômega-3 é um ácido graxo poli-insaturado essencial, encontrado em fontes marinhas, como óleos de peixes de águas frias, e também já é utilizado na forma de suplemento, principalmente por suas propriedades anti-inflamatórias (LARSSON et al., 2004; OH et al., 2010). Além disso, em ratos portadores de tumores modelos de caquexia, estudos mostram a eficiência do ômega-3 na atenuação do catabolismo no músculo esquelético (WHITEHOUSE et al., 2001), e na diminuição do crescimento tumoral (BELO et al., 2010; KATO et al., 2002; SCHIESSEL et al., 2015). Assim, tanto o ômega-3 quanto a leucina têm sido estudados como estratégias de atenuação do estado caquético (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; DE FRANCESCHI et al., 2013; HARLE et al., 2005), porém suas propriedades como preventivas ao aparecimento da doença ainda não foram exploradas.

Em situações de câncer, o estresse oxidativo é caracterizado pelo desbalanço entre as defesas antioxidantes e a alta geração das espécies reativas de oxigênio, permitindo a alta proliferação celular das células cancerígenas (DE FRANCESCHI et al., 2013; SOSA et al., 2013). A modulação desta condição com o uso de leucina ou ômega-3 como suplementação em casos de câncer já se mostrou importante na melhora das respostas antioxidantes durante o desenvolvimento tumoral (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; HAJAJI et al., 2012; LAVIANO; RIANDA; MOLFINO, 2013).

Considerando a falta de estudos sobre a modulação preventiva a partir do uso da leucina e do ômega-3, com o uso da suplementação materna, contra os efeitos deletérios da caquexia, avaliamos sua influência nas respostas à caquexia em ratos adultos portadores de tumor, descendentes da prole de mães suplementadas com estes nutrientes durante a gestação e lactação. Nossa hipótese foi que a suplementação nutricional materna com leucina e/ou ômega-3 pode prevenir os danos causados pela caquexia, através da avaliação do índice de caquexia e sobrevida, e também modular a função hepática, analisando enzimas marcadoras de dano hepático e as defesas antioxidantes.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Animais e Procedimento Experimental

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos e fêmeas (90 dias) provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas na sala de experimentação do Laboratório de Nutrição e Câncer sob condições controladas de luz, temperatura e umidade (ciclo claro/escuro de 12/12h;  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 50-60%, respectivamente). Os animais foram monitorados diariamente, pesados três vezes por semana e tiveram acesso livre a água e comida.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob número de protocolo: #2463-1 e #3424-1 e foi conduzido de acordo com os padrões de ética vigentes do *United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research* (“UKCCC”, 1998).

As ratas foram colocadas para cruzar segundo o método de harem (2 fêmeas: 1 macho) (H.L.; J.R; WEIBROTH, 1991). Após a detecção da gestação, as fêmeas foram separadas dos machos. As ratas grávidas foram distribuídas em quatro grupos (n=4/grupo) de acordo com as dietas recebidas: Controle; Leucina; Ômega-3; e Leucina/Ômega-3, delineando quatro grupos experimentais. Essas dietas foram administradas durante todo período de gestação (21 dias) e lactação (21 dias). A prole obtida de cada um desses grupos foi reduzida a oito filhotes por mãe, durante a lactação, e após o desmame a prole de machos (n máximo de /grupo), passou a receber dieta Controle até a vida adulta, a fim de avaliarmos apenas a influência da dieta materna, delineando os seguintes grupos:

C – dieta Controle durante a vida intrauterina, amamentação e até a vida adulta.  
Não portadores de tumor;



W - dieta Controle durante a vida intrauterina, amamentação e até a vida adulta e portadores de tumor;

WL – dieta Leucina durante a vida intrauterina, amamentação e dieta Controle até a vida adulta e portadores de tumor;

WO – dieta Ômega-3 durante a vida intrauterina, amamentação e dieta Controle até a vida adulta e portadores de tumor;

WLO - dieta Leucina/Ômega-3 durante a vida intrauterina, amamentação e dieta Controle até a vida adulta e portadores de tumor.

Na idade adulta, 120 dias, os ratos portadores de tumor receberam implante tumoral, por via subcutânea, de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células viáveis do tumor de Walker- 256 no flanco direito, segundo procedimento já previamente padronizado (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; VIANA et al., 2016). Foram realizados dois experimentos: o experimento A para análise dos parâmetros de caquexia e respostas hepáticas e o experimento B para análise da sobrevida dos animais. No experimento A, a eutanásia dos animais (n= 4-6/grupo) ocorreu após 21 dias de crescimento tumoral, por decapitação, incluindo o grupo Controle; o fígado, tumor e carcaça foram pesados e também coletadas amostras de sangue e tecido hepático. No experimento B, os animais (n=5-6/grupo) foram avaliados quanto ao tempo de sobrevida, sendo monitorados diariamente até o momento pré-agônico ou de morte natural dos animais. A linha esquemática da experimentação está apresentada na Figura 1.

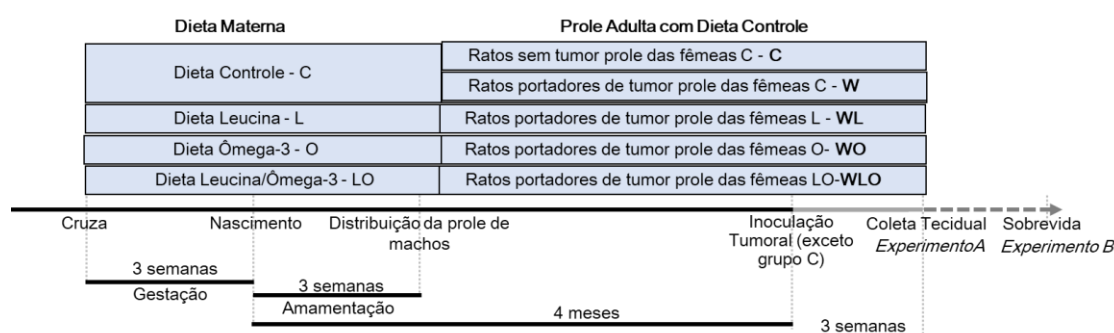


Fig. 1 – Esquema do procedimento experimental. Legenda: C, controle; W, animais portadores de tumor; WL, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina; WO, animais portadores de tumor com dieta materna ômega-3; e WLO, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina e ômega-3. O número mínimo de 4-6 por grupo.

## 1.2. Dietas

As dietas semi-purificadas seguiram o padrão do *American Institute of Nutrition* (AIN-93, (REEVES, 1993)). Assim, a dieta Controle (C) continha 18% de proteínas e 7 % de lipídeos (fonte: óleo de soja); na dieta Ômega-3 houve substituição lipídica do óleo de soja pelo óleo de fígado de bacalhau, mantendo os 7% de lipídeos, mas com maior quantidade de ômega-3; a dieta Leucina teve a mesma composição da dieta controle com enriquecimento de 3% de L-Leucina; e a dieta Leucina/Ômega-3 compreendeu a junção das duas dietas contendo enriquecimento de 3% de L-Leucina e a substituição lipídica do óleo de fígado de bacalhau. As composições das dietas e dos óleos utilizados estão apresentadas na Tabela 1. A quantidade de óleo de peixe e L-Leucina utilizados foi baseada em estudos prévios (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; MABASA et al., 2013). As dietas foram preparadas no Laboratório de Nutrição e Câncer e no caso das dietas com óleo de fígado de bacalhau na composição, estas foram armazenadas à -20°C e protegidas de iluminação para prevenção da oxidação.

## 1.3. Parâmetros de Caquexia

O índice de caquexia foi calculado a partir da seguinte fórmula: Índice de Caquexia= [(massa corpórea inicial – massa corpórea final + peso tumoral + ganho de peso do grupo Controle)/ ( massa corpórea inicial + ganho de peso do grupo Controle )] x 100%, de acordo com estudo de Guarnier e colaboradores (GUARNIER et al., 2010).

As proteínas totais e albumina séricas foram quantificadas utilizando-se Kit comercial, por análise colorimétrica através de espectrofotômetro, seguindo as instruções do fabricante (Laborlab, Brazil); para cálculo do conteúdo de globulinas sérias foi feita a subtração dos valores de proteínas totais menos albumina.

Tabela 1 – Composição dos Óleos e Ácidos Graxos							
		Óleos		Dietas			
Nome	Sigla	Óleo de Soja	Óleo de Peixe	Controle	Leucina	Ômega-3	Leucina e Ômega-3
Ácidos Graxos Saturados							
Ácido Mirístico	14:00	0,09±0,00	4,71±0,05*	0,01±0,00	0,01±0,00	0,39±0,01*	0,39±0,02*
Ácido Palmítico	16:00	10,73±0,01	10,11±0,14*	0,89±0,05	0,87±0,07	0,83±0,02*	0,84±0,04*
Ácido Estearico	18:00	3,84±0,00	1,96±0,04*	0,32±0,02	0,31±0,03	0,16±0,00*	0,16±0,01*
Ácidos Graxos Mono-insaturados							
Ácido Palmitoleico	16:1 n-7	0,09±0,00	9,56±0,01*	0,01±0,00	0,01±0,00	0,78±0,02*	0,80±0,03*
Ácido Oleico	18:1 n-9	0,06±0,00	15,53±0,11*	0,01±0,00	0,01±0,00	1,27±0,03*	1,29±0,05*
Ácido Gondoico	20:1 n-9	ND	6,88±0,03*	ND	ND	0,56±0,01*	0,57±0,02*
Ácido Gadoleico	20:1 n-11	0,22±0,00	7,73±0,02*	0,02±0,00	0,02±0,00	0,63±0,01*	0,64±0,03*
Ácido Cetoleico	22:1 n-11	ND	9,67±0,04*	ND	ND	0,79±0,02*	0,80±0,03*
Ácidos Graxos Poli-insaturados							
Ácido Linoleico	18:2 n-6	50,70±0,02	1,71±0,04*	4,22±0,24	4,13±0,34	0,14±0,00*	0,14±0,01*
Ácido Linolênico	18:3 n-3	5,76±0,01	0,66±0,00*	0,48±0,03	0,47±0,04	0,05±0,00*	0,06±0,00*
Ácido Estearidônico	18:4 n-3	ND	1,99±0,00*	ND	ND	0,16±0,00*	0,17±0,01*
Ácido Eicosapentaenoico	20:5 n-3	ND	9,69±0,05*	ND	ND	0,79±0,02*	0,81±0,03*
Ácido Docosapentaenoico	22:5 n-3	ND	1,09±0,00*	ND	ND	0,09±0,00*	0,09±0,00*
Ácido Docosahexaenoico	22:6 n-3	ND	9,42±0,15*	ND	ND	0,77±0,02*	0,78±0,03*
PUFA n-6		50,70±0,02	1,71±0,04*				
PUFA n-3		5,76±0,01	22,84±0,20*				
Razão ω-6/ω-3		8,80±0,02	0,08±0,00*				
As análises de composição de ácidos graxos foram realizadas em duplicata por cromatografia gasosa. Todos os dados estão apresentados como valores médios ± SEM. A composição de ácidos graxos está apresentada como a porcentagem de cada ácido graxo individual no pool total de todos os ácidos graxos (%). * Comparado com o grupo C, P <0,05: diferenças significativas entre os óleos no teste T; ND: não detectado.							

#### 1.4. Enzimas e Estresse Oxidativo hepáticos

Amostras de tecido hepático foram homogeneizadas em tampão (1:4; 20mMTris, 1mMDTT, 2mMATP e 5mMMgCl<sub>2</sub>; Sigma, EUA) e centrifugadas a 13.000g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para as medições de atividade e conteúdo

enzimático das enzimas relacionadas à função e estresse oxidativo hepáticos. O conteúdo de proteínas hepáticas de cada amostra foi avaliado por método de Bradford (BRADFORD, 1976) e utilizado para normalização dos cálculos dos diferentes parâmetros pela quantidade de proteínas nas diferentes amostras.

As quantidades das enzimas gama glutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (AP) no tecido hepático foram quantificadas utilizando-se Kits comerciais, por espectrofotometria seguindo as recomendações do fabricante (Bioclin, Brasil).

A atividade da glutathione -S- transferase (GST) foi avaliada no homogeneizado baseada na conjugação de 1mM 1- cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; Sigma) com glutathione, seguindo metodologia descrita por Habig e colaboradores, e expressa em nmol/μg de proteínas/min (JAKOBY, 1974). A glutathione redutase (GSH) foi medida seguindo a metodologia previamente padronizada em nosso laboratório (TOLEDO; VENTRUCCI; GOMES-MARCONDES, 2011). A atividade da catalase foi medida por metodologia descrita por Cohen e colaboradores, com resultado expresso em nmol/min/μg de proteínas (COHEN; DEMBIEC; MARCUS, 1970). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com protocolo de Winterbourn e colaboradores, levando em consideração a habilidade da superóxido dismutase na inibição da redução de *nitro-blue tetrazolium*, os resultados foram expressos por unidade de arbitria de SOD/mg de proteínas (WINTERBOURN et al., 1975). O marcador de peroxidação lipídica - malondialdeído (MDA) - foi quantificado pela incubação das amostras em n-metil-2-fenilindol (MPO; Sigma) e lida a absorbância em 590 nm, como descrito previamente (MIHARA; UCHIYAMA, 1978); os resultados foram normalizados pela quantidade de proteínas das amostras e expressos em nmol/μg de proteínas.

### 1.5. Análises Estatísticas

A média de sobrevida foi calculada de acordo com o método de Kaplan-Meier, seguido pelo teste de Log-rank, comparando cada curva de sobrevida, considerando significativas as diferenças quando  $P \leq 0.05$ . Os demais resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para comparação entre os grupos, os dados foram avaliados utilizando ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste de Bonferroni e diferenças significativas quando  $P \leq 0.05$  (*Graph Pad Prism software*, versão 7.0, EUA) (GAD, S. C.; WEIL, 1994).

## 2. Resultados

### 2.1. Evolução de Peso da Prole e Parâmetros de Caquexia

Os diferentes esquemas de dieta materna não alteraram o peso da prole após o desmame (21 dias de vida), apresentando evolução de peso semelhante entre os grupos até o momento da inoculação tumoral (120 dias de idade) (Figura 2). Antes da inoculação tumoral, foram avaliados parâmetros bioquímicos, como glicemia, proteinemia e albuminemia, para certificar que todos os animais estavam sob as mesmas condições e verificou-se que não houve diferenças quanto a esses parâmetros (dados não mostrados).

Todos os grupos apresentaram semelhante peso corpóreo no momento da inoculação tumoral (Figura 2A) e após a inoculação tumoral, o peso de carcaça mostrou-se reduzido no grupo W em comparação ao grupo C; já o grupo WO teve um aumento deste parâmetro (C x W,  $P=0.0087$ ; C x WO,  $P=0.0159$ ; Figura 2B). Para os demais grupos não houve diferenças. Os animais portadores de tumor apresentaram diminuição sérica das proteínas totais e albumina, com decréscimo maior no grupo W em relação ao grupo C (redução comparada ao grupo C: W - 28% WL - 23%; WO - 18% e WLO - 16%, Tabela 2).

Quanto à evolução tumoral, o peso de tumor não foi diferente entre os grupos (Figura 2C), sendo maiores do que 10% do peso relativo dos animais. O índice de caquexia foi maior no grupo W ( $31.83 \pm 2.9\%$ ), mostrando o impacto da evolução da doença, porém este parâmetro foi menor nos grupos suplementados maternalmente com óleo de peixe e leucina - WO e WLO - quando comparados a W ( $P=0.0380$ ;  $P=0.0187$ , respectivamente, Figura 2D).

**Tabela 2** – Parâmetros Séricos Após Evolução

	C	W	WL	WO	WLO
Proteínas Totais (g/dL)	5,837 $\pm$ 0,195	4,070 $\pm$ 0,169*	4,516 $\pm$ 0,381*	4,436 $\pm$ 0,325*	4,602 $\pm$ 0,343*
Albumina (mg/dL)	3,849 $\pm$ 0,103	2,815 $\pm$ 0,322*	2,97 $\pm$ 0,263*	3,151 $\pm$ 0,283*	3,228 $\pm$ 0,171*
Albumina/Globulina (mg/dL)	1,969 $\pm$ 0,107	2,645 $\pm$ 0,620	2,167 $\pm$ 0,383	2,609 $\pm$ 0,497	2,595 $\pm$ 0,359

Legenda: C, controle; W, animais portadores de tumor; WL, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina; WO, animais portadores de tumor com dieta materna ômega-3; e WLO, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina e ômega-3. O conteúdo de proteínas totais e albumina séricas foram determinados por meio de medidas espectrofotométricas utilizando kits específicos da Laborlab. Os resultados são expressos como as médias  $\pm$  SEM. O número mínimo de animais foi de 4 a 6 por grupo. \* Comparado com o grupo C,  $P < 0,05$ .

## 2.2. Sobrevida

As curvas de sobrevida foram significativamente diferentes ( $P=0.0016$ ) com a menor mediana de sobrevida encontrada no grupo com tumor ( $W= 30.5$  dias). Os grupos suplementados maternalmente obtiveram maiores médias de sobrevida: WL (34.5 dias); WO (32 dias); WLO (35 dias) (Figura 2E).

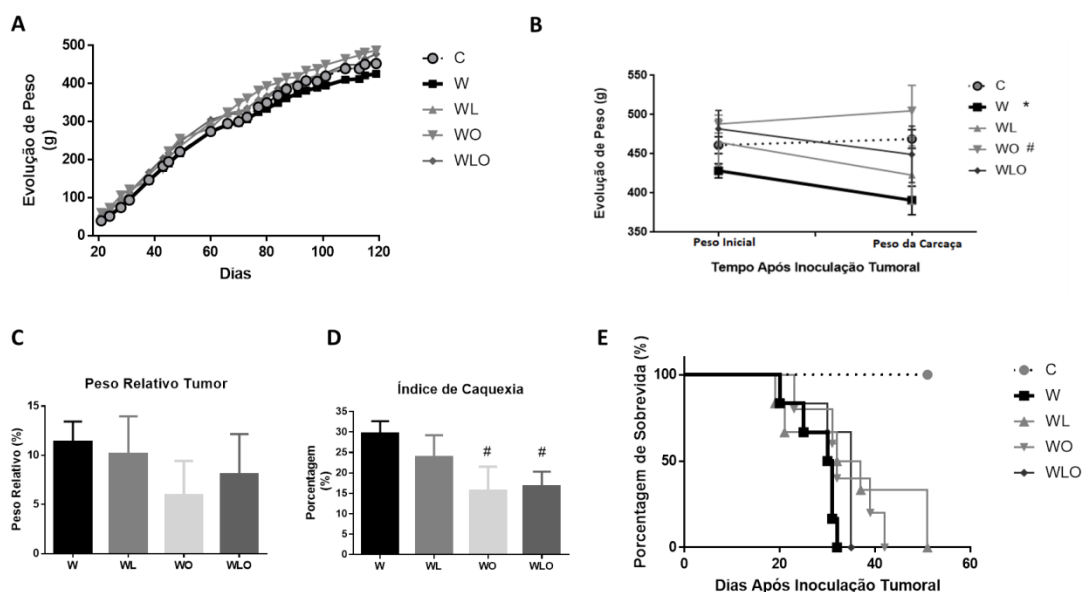


Figura 2 – Parâmetros morfológicos dos grupos experimentais. **A**, Ganho de peso corpóreo da prole após desmame até 120 dias de idade, antes da inoculação tumoral (g). **B**, Peso inicial e peso da carcaça após 21 dias de crescimento tumoral (g). **C**, Peso relativo do tumor, expresso em porcentagem (%). **D**, índice de caquexia de ratos portadores de tumor após 21 dias de crescimento tumoral, expresso como porcentagem (%). **E**, Taxa de sobrevida dos grupos após a inoculação do tumor ( $N = 5-6$  animais por grupo portador do tumor). Legenda vide Tabela 2: O número de ratos adultos foi de 4-6 por grupo. Valores foram expressos como médias  $\pm$  SEM. \*Comparado com o grupo C,  $P < 0,05$ , #Comparado com o grupo W,  $P < 0,05$ , baseado em ANOVA *one-way* seguido pelo teste de Bonferroni.

## 2.3. Parâmetros Hepáticos frente à Caquexia.

O peso relativo do fígado no grupo portador de tumor (W) foi aumentado em relação ao Controle ( $P=0.05$ ), mostrando a hepatomegalia que pode ocorrer em situações de caquexia, porém para os demais grupos não foi encontrado este aumento (Figura 3A). Em relação à função hepática, a quantidade da enzima GGT diminui apenas no grupo WO quando comparado ao C ( $P=0.025$ ) e W ( $P=0.009$ ) (Figura 3B). A quantidade de ALT no tecido

hepático foi diminuída em WO em comparação a C ( $P=0.0333$ ), e não houve mudanças para os demais grupos (Fig. 3C). Quando comparado ao controle, a AST hepática aumentou no grupo W ( $P=0.0556$ ) e houve diminuição nos demais grupos maternalmente suplementados em relação a W (WL ( $P=0.0333$ ), WO ( $P=0.0143$ ) e WLO ( $P=0.0079$ ), Figura 3D). A razão AST/ALT aumentou no grupo W comparado a C ( $P=0.0152$ ), enquanto não houve diferença entre os grupos suplementados maternalmente (Figura 3E).

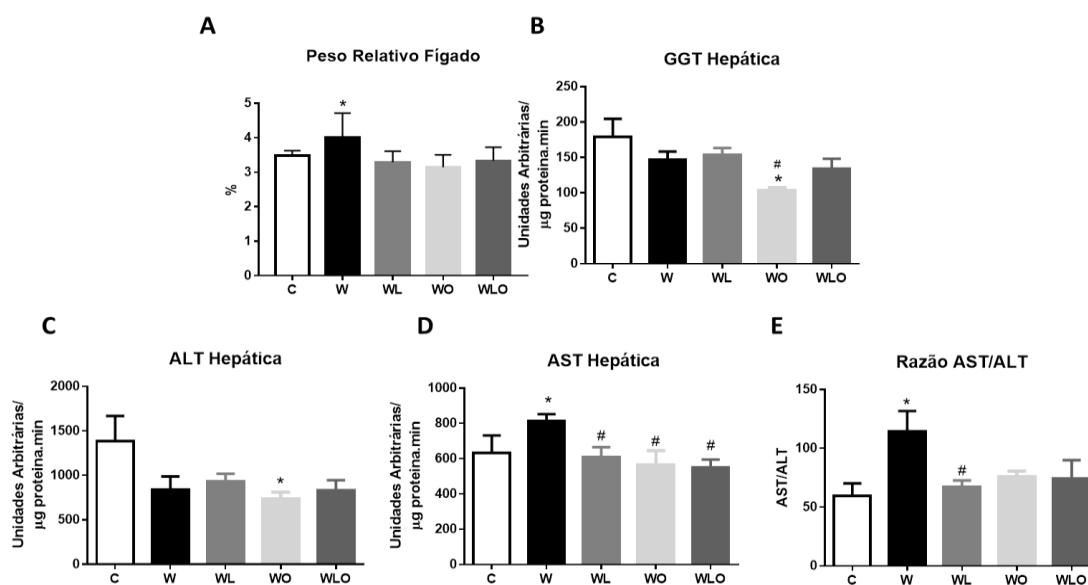


Figura 3 – Parâmetro morfométrico e atividades/conteúdo enzimático hepático após alterações na dieta materna. **A**, peso relativo do fígado. **B**, conteúdo de GGT hepático, expresso em unidades arbitrárias/μg de proteína/min. **C**, conteúdo de ALT hepático, expresso em unidades arbitrárias/μg de proteína. **D**, conteúdo de AST hepático, expresso em unidades arbitrárias/μg de proteína. **E**, razão AST/ALT. O conteúdo hepático das enzimas apresentadas foi normalizado pela quantidade de proteínas totais do tecido [40]. Legenda: C, controle; W, animais portadores de tumor; WL, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina; WO, animais portadores de tumor com dieta materna ômega-3; e WLO, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina e ômega-3. O número de animais foi de 4-6 por grupo. Valores apresentados como médias  $\pm$  SEM. \* Comparado com o grupo C,  $P < 0,05$ , # Comparado com o grupo W,  $P < 0,05$ , baseado na análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Condizente com os efeitos deletérios do crescimento tumoral no tecido hepático foi observado que o grupo W apresentou maior valor de atividade da fosfatase alcalina

( $P=0.0190$ ) e SOD ( $P=0.0309$ ) quando comparado ao C (Figura 4A). Em relação ao controle, o grupo W não apresentou diferenças para as atividades das enzimas GST e catalase, e quanto a concentração de GSH (Figura 4C, D e E), porém houve aumento do conteúdo de MDA ( $P=0.0556$ ) e também diminuição da razão GST/MDA ( $P=0.0151$ ) (Figura 4G).

A influência da dieta materna sob o tecido hepático pode ser vista em todos os grupos suplementados. Assim, os grupos WL, WO, WLO apresentaram valores similares da atividade da fosfatase alcalina (Figura 4A) quando comparados ao controle e esta atividade foi diminuída quando comparados a do grupo W ((WL,  $P=0.0317$ ; WO,  $P=0.0286$ ; e WLO,  $P=0.0571$ ). Analisando a atividade da SOD, os grupos WL e WO apresentaram valores semelhantes ao grupo C, apenas o grupo WLO teve menor atividade quando comparado a C ( $P=0.0276$ ) e a W ( $P=0.0035$ ) (Figura 4B). Em todos os grupos experimentais, não houve diferenças na atividade da GST em relação ao controle (Figura 4C). Para a GSH, seu conteúdo foi similar entre os grupos WL, WO e C, porém houve decréscimo no grupo WLO em comparação ao C ( $P=0.0067$ ) (Figura 4D). Quanto ao conteúdo de MDA, foram apresentados valores semelhantes em WL, WO, WLO e C, porém aumentado no grupo W em relação a C ( $P=0.0556$ ) e os grupos maternalmente suplementados mostraram valores de MDA diminuídos em relação a W (WL,  $P=0.0095$ ; WO,  $P=0.0140$  e WLO,  $P=0.0224$ ) (Figura 4F). A resposta antioxidante avaliada pela razão GST/MDA mostrou efeito positivo da suplementação materna com leucina e/ou óleo de peixe (WL, WO, WLO) uma vez que esses grupos apresentaram aumento dessa razão em relação ao grupo W (WL,  $P=0.0025$ ; WO,  $P=0.0109$ ; WLO,  $P=0.0334$ ) e o grupo portador de tumor, sem suplementação (W) mostrou razão diminuída quando comparado ao controle ( $P=0.0151$ ) (Figura 4G).



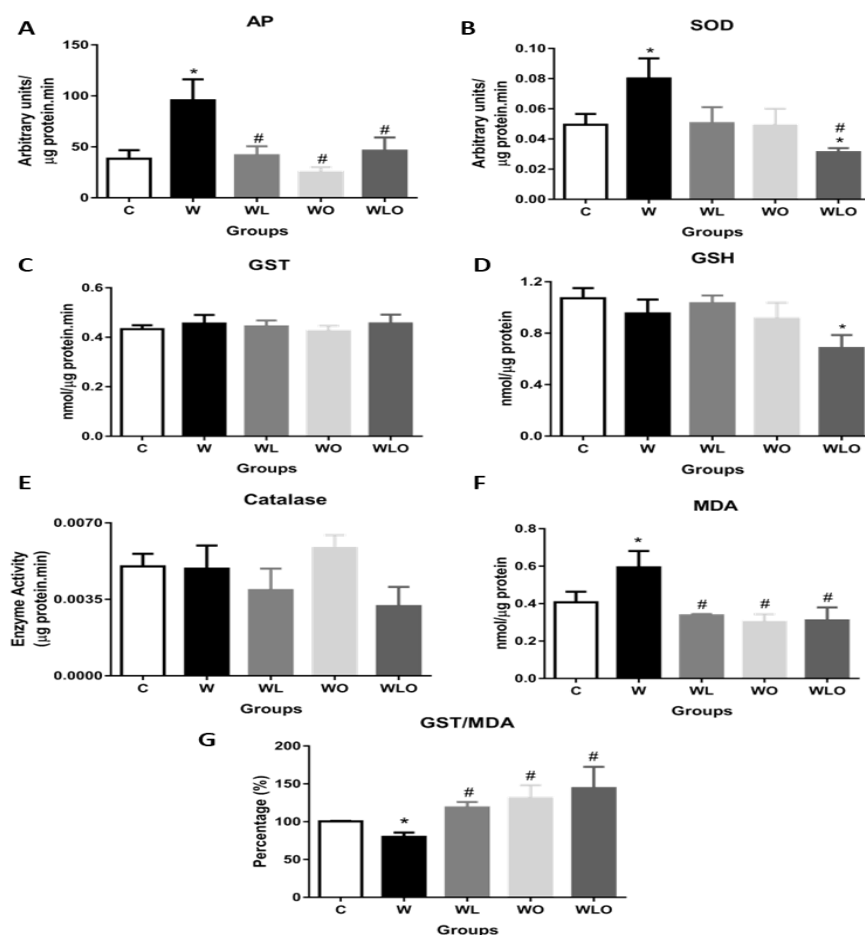


Figura 4 – Defesas antioxidantes hepáticas e conteúdo de marcador de estresse oxidativo. **A**, atividade da fosfatase alcalina (AP), expressa em unidades arbitrárias/μg proteína/min. **B**, atividade da superóxido dismutase (SOD), expressa em unidades arbitrárias/μg proteína/ min. **C**, atividade da glutathiona-S-transferase (GST), em nmol/μg proteína/min. **D**, conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), em nmol/μg de proteína. **E**, atividade da catalase, expressa em unidades arbitrárias/μg proteína / min. **F**, conteúdo de malondialdeído (MDA), em nmol/μg de proteína. **G**, razão GST/MDA, expressa em porcentagem (%). Legenda: C, controle; W, animais portadores de tumor; WL, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina; WO, animais portadores de tumor com dieta materna ômega-3; e WLO, animais portadores de tumor com dieta materna rica em leucina e ômega-3. O número de animais foi de 4-6 por grupo. Valores apresentados como médias  $\pm$  SEM. \* Comparado com o grupo C,  $P < 0,05$ , # Comparado com o grupo W,  $P < 0,05$ , baseado na análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

### 3. Discussão

Em pacientes com câncer, a caquexia está geralmente relacionada a um prognóstico ruim e reduzida sobrevida, sendo responsável por cerca de 20% das mortes relacionadas ao câncer (TISDALE, 2010). Diversos estudos mostram a suplementação

nutricional como uma alternativa adjuvante ao tratamento do câncer e da caquexia, sendo que esta suplementação também pode ser utilizada como forma preventiva (FLABOURARIS; KARIKAS, 2016; TISDALE, 2003). Uma vez que os óleos de peixes ricos em ômega-3 e o aminoácido de cadeia ramificada leucina já vêm sendo testados para o tratamento de câncer e já mostraram resultados positivos em resposta à caquexia em animais portadores de tumor (CRUZ et al., 2016; FEARON et al., 2006; PAPPALARDO; ALMEIDA; RAVASCO, 2015; SALOMÃO et al., 2010; TONETO et al., 2016; VAUGHAN; HASSING; LEWANDOWSKI, 2013), neste estudo, avaliamos esses nutrientes como preventivos aos efeitos deletérios desta doença, na forma de suplementação nutricional materna. Foram escolhidos os períodos de gestação e lactação., importantes fases em que os nutrientes podem modular a expressão gênica e respostas metabólicas do indivíduo, podendo prevalecer até a vida adulta. Essa abordagem foi baseada em recentes estudos no campo de nutri-epigenômica, o qual investiga como a nutrição materna pode remodelar o epigenoma da prole, levando a predisposição ou proteção a doenças na vida adulta, como o câncer (PERERA; HERBSTMAN, 2011; VANDEN BERGHE, 2012). Neste estudo, demonstramos que os efeitos da caquexia puderam ser modificados pela influência da dieta materna suplementada com o óleo de peixe e/ou leucina, uma vez que encontramos uma atividade hepática preservada e melhora nas respostas antioxidantes nos grupos maternalmente suplementados.

Existem estudos relacionando a melhora na sobrevida com o uso da suplementação com ômega- 3 (EPA, DHA), porém são escassos os estudos quanto a esta resposta frente à suplementação nutricional com leucina e combinação com ômega-3(LAVIANO; RIANDA; MOLFINO, 2013). Neste estudo, verificamos esta resposta com a suplementação materna com esses nutrientes, mostrando que o grupo portador de tumor mostrou menor sobrevida, porém houve melhora neste parâmetro em todos os grupos suplementados maternalmente, promovendo uma maior sobrevida. Assim, essa melhora para os grupos maternalmente suplementados mostrou o efeito benéfico desta suplementação frente à caquexia. Mabasa e colaboradores observaram que o óleo de canola, com uma baixa razão ômega-6/ômega-3, melhorou a sobrevida de animais portadores de tumor maternalmente suplementados com esse óleo (MABASA et al., 2013), consistente com este estudo, encontramos melhora na sobrevida nos grupos suplementados com o óleo de fígado de bacalhau sozinho ou em combinação com a leucina.

Neste trabalho, os diferentes esquemas nutricionais não influenciaram o crescimento dos animais desde o desmame até a vida adulta. No grupo com tumor, após instalação da caquexia, encontramos uma severa espoliação na carcaça típica dessa condição

(FEARON et al., 2011b), porém os grupos suplementados na vida materna com óleo de peixe e, também, associado à leucina apresentaram menor índice de caquexia, mostrando melhora nessa condição de espoliação pela dieta administrada por via materna. Estudos recentes mostraram que ambos os suplementos - leucina ou óleo de peixe - modulam eficientemente parâmetros de caquexia (CRUZ et al., 2016; LINDSEY HARLE, B.S.; TODD BROWN, M.D.; DANIEL LAHERU, M.D.; ADRIAN S. DOBS, 2005). Em nossos estudos anteriores, o índice de caquexia foi melhorado em animais tratados com leucina durante o período do tumor (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; VIANA et al., 2016). Consistente com a literatura, nossos dados demonstraram que o menor índice de caquexia pode ser efeito da influência nutricional materna, uma vez que os grupos suplementados apenas com óleo de peixe ou em associação com leucina tiveram a capacidade de ajustar alguns parâmetros fisiológicos, levando a esta redução.

A hepatomegalia pode ocorrer como consequência do desenvolvimento tumoral e é provavelmente causada pelo metabolismo hepático intenso, resultando no aumento da produção de proteína-C-reativa, em resposta à inflamação, e / ou edema (MORRIS-STIFF; GOMEZ; PRASAD, 2008). Corroborando este fato, observamos aumento do peso relativo do fígado no grupo portador de tumor, porém este parâmetro foi preservado nos grupos suplementados com leucina e/ou óleo de peixe. As enzimas hepáticas GGT, ALT e AST, indicam atividade hepática em relação aos processos de desintoxicação e metabolismo de aminoácidos (AGRAWAL; DHIMAN; LIMDI, 2016; LIU et al., 2014; WHITFIELD, 2001). Nesta visão, a associação do aumento da atividade da AST e diminuição da atividade da ALT, que corresponde a uma relação AST / ALT aumentada, foi verificada apenas no grupo W, sugerindo uma disfunção hepática causada pela sobrecarga tecidual durante a progressão da caquexia (CRUZ et al., 2016; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2016). Além disso, apesar de serem portadores de tumor, os grupos suplementados maternalmente com leucina e/ou óleo de peixe exibiram melhora da função hepática e do peso da carcaça, que foi preservada nesses animais, refletindo a um índice de caquexia mais baixo e possivelmente modificando a média de sobrevivência. Outro ponto relacionado à função hepática é a atividade celular global, indicada pela enzima fosfatase alcalina (MARTINS; NEGRÃO; HIPÓLITO-REIS, 2001b), cujos níveis aumentam em patologias como o câncer (VENTRUCCHI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2004). Nossos resultados confirmaram esse efeito apenas no grupo W, porém os grupos que receberam suplementação nutricional materna (WL, WO e WLO) apresentaram níveis de fosfatase alcalina semelhantes aos dos controles, o que indicou uma melhora da disfunção hepática induzida pelo tumor.

No estado de caquexia, as defesas antioxidantes são prejudicadas e os níveis de espécies reativas de oxigênio são aumentados. Este desequilíbrio pode promover o desenvolvimento e progressão tumoral, o que provavelmente afeta muitos tecidos e órgãos do hospedeiro, especialmente o fígado (SOSA et al., 2013). Portanto, nossos resultados corroboram esses achados, uma vez que as atividades das enzimas antioxidantes hepáticas e o produto da peroxidação lipídica e marcador de estresse oxidativo (MDA) foram significativamente aumentados apenas no grupo W, indicando uma resposta comprometida ao dano oxidativo. Embora, tendo uma atividade de SOD maior, o grupo W apresentou uma defesa primária, pois a SOD age contra o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) quando a célula está sob estresse oxidativo catalisando a oxidação do ânion superóxido em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido ( $H_2O_2$ ) (SATO et al., 1992). No entanto, os processos subsequentes, como a decomposição de  $H_2O_2$  em água pela enzima catalase e o efeito detoxificante da GST para a manutenção da integridade celular (TSUCHIDA; SATO, 1992), provavelmente teve um menor efeito, pois o conteúdo aumentado de MDA contribuiu para diminuir a função hepática no grupo W. Por outro lado, os grupos submetidos à suplementação com dieta materna apresentaram respostas hepáticas semelhantes às do grupo controle, especialmente as relacionadas às enzimas hepáticas e atividades antioxidantes, sugerindo que a suplementação nutricional materna foi capaz de reduzir os danos causados pelo tumor. Este efeito reduziu a sobrecarga hepática, que é um órgão intensamente recrutado na situação de progressão tumoral. Assim, encontramos aqui, pela primeira vez, que estes parâmetros podem ser influenciados pela suplementação nutricional materna com óleo de peixe e / ou leucina. Uma vez que as limitações deste estudo foram relacionadas com a duração e o tamanho do experimento, consideramos que ainda há mais pontos devem ser investigados quanto a função hepática e também minimização do processo caquético. Novos experimentos estão em andamento em nosso laboratório envolvendo ensaios relacionados à sinalização celular e alterações epigenéticas para melhor entender como a dieta materna pode neutralizar os efeitos danosos da evolução do tumor.

Em suma, a suplementação nutricional materna com óleo de peixe e / ou leucina modulou as atividades das enzimas antioxidantes alteradas no fígado, reduzindo o estresse oxidativo, avaliado pelos níveis mais baixos de MDA. Além disso, e primeiramente demonstrado, o uso de dietas ricas em leucina e / ou óleo de peixe durante os períodos de gestação e desmame melhoraram os parâmetros prejudicados pela caquexia, modificando a média de sobrevivência. Assim, sugerimos que a suplementação nutricional materna pode ser eficaz nos descendentes adultos quanto à prevenção dos efeitos deletérios da caquexia.

## CAPÍTULO II

**Administração de dieta materna rica em leucina minimizou a perda de massa muscular na prole de ratos adultos portadores de tumor através da melhora do balanço entre a síntese e degradação proteica muscular.**

*(“Maternal Leucine-Rich Diet Minimizes Muscle Mass Loss In Tumour-Bearing Adult Rat Offspring By Improving The Balance Of Muscle Protein Synthesis And Degradation.”)*

**O presente trabalho foi apresentado em inglês no dia 21 de Maio de 2019, correspondendo à primeira versão submetida à revista *Biomolecules*.**

*This chapter II was presented in English on 21<sup>st</sup> May 2019, and corresponds to the initial version submitted to Biomolecules journal.*

**Versão final publicada na revista: *Biomolecules* (2019):**

Miyaguti, Natália Angelo da Silva; Oliveira, Sarah Christine Pereira de ; Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra . Maternal Leucine-Rich Diet Minimises Muscle Mass Loss in Tumour-bearing Adult Rat Offspring by Improving the Balance of Muscle Protein Synthesis and Degradation. *Biomolecules*, v. 9, p. 229, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9060229>

### **Resumo do Capítulo II**

Introdução: A caquexia é uma síndrome que afeta até 85% dos pacientes com câncer avançado, sendo necessárias estratégias de prevenção desta condição. A suplementação nutricional materna pode modificar a programação metabólica da prole através de modificações herdáveis até a vida adulta, sendo uma estratégia positiva na prevenção de doenças, como o câncer. Estudos mostram que uma dieta rica em 3% de leucina, administrada de maneira terapêutica, melhora o *turnover* proteico, através da modulação da via da mTOR e vias proteolíticas em ratos portadores de tumor. Dada à importância de estratégias de prevenção, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a dieta materna rica em leucina também melhora o *turnover* proteico muscular em ratos adultos portadores do tumor de Walker-256 a partir da modulação dos processos de síntese e degradação proteica.

Métodos: Foram utilizadas ratas Wistar grávidas submetidas à dieta controle ou dieta rica em leucina (3%), durante o período de gestação e lactação. Após desmame, os machos das proles foram submetidos à dieta controle até a vida adulta. Aos 120 dias de idade foi realizada a inoculação tumoral, delineando os seguintes grupos (n=7-8 por grupo): C,

grupo controle; W, grupo portador de tumor; L, grupo suplementado com dieta materna rica em leucina; WL, grupo portador de tumor suplementado com dieta materna rica em leucina. Foram avaliados os processos de síntese e degradação proteica no músculo gastrocnêmio, e analisadas algumas proteínas específicas da via da mTOR, subunidades da via ubiquitina-proteassomo, atividades das enzimas calpaína e catepsina H.

**Resultados:** Houve intensa espoliação no músculo gastrocnêmio no grupo W, sendo esta menos intensa no grupo WL, apesar do peso tumoral não ter sido diferente entre os grupos. Além de não haver uma diminuição do peso muscular, o grupo WL também apresentou manutenção dos processos de síntese e degradação no músculo gastrocnêmio associada a uma maior ingesta quando comparado ao grupo W. As atividades das enzimas catepsina H e calpaína foram mantidas no grupo WL quando comparado ao grupo L e, como esperado, as expressões da mTOR e a p70S6K foram diminuídas em W, porém no grupo WL foram mantidas.

**Conclusões:** A suplementação materna com leucina melhorou parâmetros relacionados à diminuição da espoliação no músculo gastrocnêmio em ratos adultos portadores de tumor. Assim, o estudo provê dados inovadores quanto ao uso da dieta materna como preventiva aos danos causados pela caquexia na prole adulta, permitindo futura investigação dos mecanismos epigenéticos que culminarem nestes benefícios.

**Maternal leucine-rich diet minimises muscle mass loss in tumour-bearing adult rat offspring by improving the balance of muscle protein synthesis and degradation.**

**Natália Angelo da Silva Miyaguti<sup>1</sup>, Sarah Christine Pereira de Oliveira<sup>1</sup> and Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes<sup>1\*</sup>**

**Abstract:** Cachexia syndrome can affect cancer patients and new prevention strategies are required. Maternal nutritional supplementation can modify metabolic programming in the offspring, which lasts until adulthood. This could be a good approach against diseases such as cancer. A 3% leucine-rich diet treatment improved muscle protein turnover by modifying the mTOR and proteolytic pathways, and thus, we analysed whether maternal supplementation could ameliorate muscle protein turnover in adult offspring tumour-bearing rats. Pregnant Wistar rats received a control diet or 3% leucine-rich diet during pregnancy/lactation, and their weaned male offspring received a control diet until adulthood when they were distributed into following groups (n=7–8 per group): C, Control; W, tumour-bearing; L, without tumour with a maternal leucine-rich diet; and WL, tumour-bearing with a maternal

leucine-rich diet. Protein synthesis and degradation were assessed in the gastrocnemius muscle, focusing on the mTOR pathway, which was extensively altered in W group. However, the WL adult offspring showed no decrease in muscle weight, higher food intake, ameliorated muscle turnover, activated mTOR and p70S6K, and maintained muscle cathepsin-H and calpain activities. Maternal leucine nutritional supplementation could be a positive strategy to improve muscle protein turnover in cancer cachexia-induced muscle damage in adult offspring rats.

**Keywords:** branched-chain amino acid; cancer cachexia; maternal influence; muscle protein turnover

## 1. Introduction

Cachexia syndrome affects around 85% of advanced cancer patients, especially in some tumour types, such as stomach, pancreas, and colon cancer, being responsible for at least 22% of deaths, and still cannot be reversed (ARGILÉS et al., 2018). Thus, strategies that can minimise or even prevent this condition are valuable and necessary. Currently, nutritional supplementation as a preventive approach and the effects of maternal nutrition on the risk of their adult offspring risk developing a disease has been widely studied (LEE, 2015; REMELY et al., 2015). During gestation and lactation, maternal dietary composition can modify several aspects of offspring metabolic programming, which is considered to be the most important environmental factor affecting the expression of metabolic pathway-related genes in the offspring. Because these modifications can be preserved into adulthood, the maternal diet can be a preventive strategy against several diseases, such as cancer (MABASA et al., 2013; MATHIAS et al., 2014).

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome that is characterised by progressive skeletal muscle mass wasting, with or without fat mass loss. Muscle wasting is related to a negative protein and energy balance because of the combination of reduced food intake and altered metabolism (FEARON et al., 2011b). This abnormal metabolism involves an imbalance between muscle protein synthesis and degradation (PORPORATO, 2016), which impacts the mTOR pathway, which is important in the control of protein synthesis (SAXTON; SABATINI, 2017; TISDALE, 2009), and also interferes with the main degradation pathways in skeletal muscle, such as ubiquitin-proteasome, lysosomal, and calcium-dependent (SMITH et al., 2011; SUDHAN; SIEMANN, 2015). In an experimental model of cancer cachexia, a 3 % leucine-rich diet , showed positive effects on protein

synthesis induction in skeletal muscle, leading activation of the mTOR pathway and reduction of protein degradation by inhibiting the ubiquitin-proteasome pathway in Walker-256 tumour-bearing rats (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2007, 2004). Studies also showed attenuated degradation and modulation of both lysosomal and calcium-dependent proteolysis in animals fed this diet (CRUZ et al., 2016; GONÇALVES; SALOMÃO; GOMES-MARCONDES, 2013). Considering the leucine supplementation capacity to cross the placental barrier and the ability to modify the breast milk composition (MELNIK, 2015; REGNAULT; VRIJER; BATTAGLIA, 2002; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013), there is some evidence supporting the use of a maternal diet as a preventive approach. Our previous study showed that 3% leucine administered as a maternal supplement could modulate cancer cachexia-induced liver damages in tumour-bearing adult offspring (MIYAGUTI; DE OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2018).

Currently, no data have been reported on the preventive influence of maternal diet with leucine supplementation on cancer cachexia, especially in the skeletal muscle tissue. Thus, the purpose of this study was to evaluate whether a maternal 3% leucine-rich diet might affect muscle wasting in adult offspring tumour-bearing rats. We hypothesised that this maternal diet can preserve muscle weight and improve the balance between muscle protein synthesis and degradation. This maternal supplementation modified these processes in the tumour-bearing rats. Thus, we analysed the proteins related to the mTOR pathway, and mTOR and p70S6K activation were maintained. Regarding the proteolysis pathways, the proteasome 20S subunit expression and the enzymes activities of cathepsin H and calpain were also preserved. Considering that the maternal environment influences the offspring stress response, we demonstrated that the maternal diet supplemented with leucine may be a positive strategy against cancer cachexia-induced deleterious effects in muscle mass of adult offspring.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals**

Adult Wistar rats (male and female; 90 days old) were obtained from the animal facility at the Multidisciplinary Centre for Biological Research of the University of Campinas. The animals were kept in individually ventilated cages in the experimental room, which was located in the Laboratory of Nutrition and Cancer, under controlled environmental conditions



(temperature,  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; light and dark, 12/12 h; and humidity, 50–60%). The rats were monitored daily, weighed three times/week, and received food and water ad libitum.

## 2.2. Diet

The diets were formulated in accordance with the American Institute of Nutrition (AIN-93; (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993)). The control diet was the AIN-93 semi-purified diet, containing 18% protein. The leucine-rich diet was the same as the control diet except for the addition of 3% L-leucine. Thus, the control diet contained 1.6% L-leucine, whereas the leucine-rich diet contained 4.6% L-leucine. The L-leucine dose was based on our previous experimental studies (CRUZ et al., 2016; GONÇALVES; SALOMÃO; GOMES-MARCONDES, 2013; VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2004).

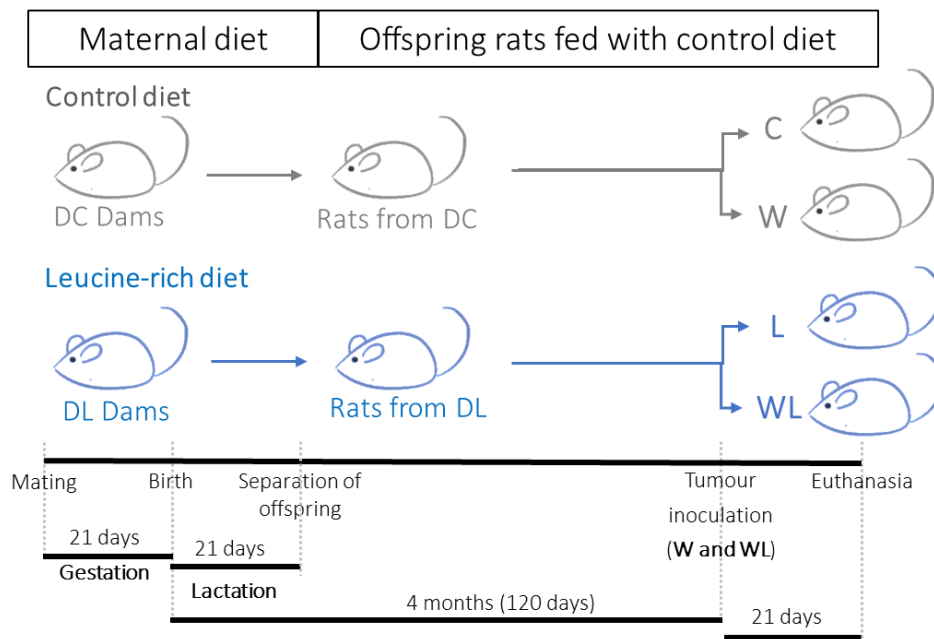
## 2.3. Experimental Procedure

The experiment was conducted according to the current ethical standards of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (VALE; STEWART; TIERNEY, 2005) and was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Institute of Biology at the University of Campinas (protocol number: #4224-1). The females were mated with the same male species (2 females:1 male) using the harem method (BAKER, 1979), and after pregnancy was detected, the females were separated from the males. The pregnant rats were distributed into two groups ( $n = 3$  per group) according to the diet administered, as follows: dams subjected to the control diet (DC) and dams subjected to the leucine-rich diet (DL). Throughout the gestation (21 days) and lactation (21 days) periods, the dams received the indicated diets, and the number of offspring was reduced to eight pups/litter.

To verify the influence of the maternal diet, after weaning, the male offspring ( $n = 7\text{--}8$  per group) were fed the control diet. At 120 days of age, the adult offspring rats were distributed into four groups according to the presence of a tumour implant and the maternal diet provided, as follows: C, fed a control diet throughout the intrauterine, lactation, and adulthood periods, without a tumour; W, fed a control diet throughout the intrauterine, lactation, and adulthood periods, and tumour-bearing; L, fed a leucine-rich diet throughout the intrauterine and lactation periods, then fed a control diet until adulthood time, without a tumour; and WL, fed a leucine-rich diet throughout the intrauterine and lactation period, then fed a control diet until adulthood time, and tumour-bearing.

Food intake was measured, and the animals were weighed during the gestation and lactation periods (dams) and throughout their development (weaning until adulthood).

The tumour-bearing rats (120 days old) received a tumour implant by subcutaneous injection of approximately  $3 \times 10^6$  viable Walker-256 tumour cells in the right flank (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; TONETO et al., 2016). After 21 days of tumour growth, all the animals were euthanised by decapitation. Blood was collected, and the gastrocnemius muscle and tumour were resected and weighed. The carcasses were then weighed. Figure 1 shows the protocol represented as a schematic timeline.



**Figure 1.** Schematic diagram of the experimental procedure. Legend: DC, dams fed control diet during gestation and lactation periods; DL, dams fed leucine-rich diet during gestation and lactation periods. Adult offspring were distributed into C, Control; W, Tumour-bearing animals; L, Group without tumour with a maternal leucine-rich diet; and WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet. For details, see the Materials and Methods section. DC (n = 3), DL (n = 3), and the final number of adult offspring rats (C, W, L, and WL) was 7–8 per group.

#### 2.4. Cachexia Indicators: Serum and Morphometric Parameters

Serum parameters, including total serum proteins, albumin, cholesterol, and triglycerides, were quantified spectrophotometrically using commercial kits (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The serum globulin was calculated by the difference between the total serum protein and albumin content. The carcass weight represents the whole-body weight without the liver, gastrocnemius muscle, and tumour.

## 2.5. Muscle Protein Degradation and Synthesis Analysis

Protein synthesis was assessed using aliquots of the gastrocnemius muscle that was immediately collected after the euthanasia, and the total L-[<sup>3</sup>H] phenylalanine uptake (Amersham Pharmácia Biotech do Brasil, Sao Paulo, Brazil) was measured, as previously described (CRUZ et al., 2016; VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2004). Protein synthesis rates were calculated by the amount of radioactivity incorporated into the gastrocnemius muscle and expressed as the count per minute (CPM) per hour per microgram of protein, normalised to 100 milligrams of muscle tissue. Protein degradation was measured in accordance with the methodology that was previously adapted in our laboratory (CRUZ et al., 2016; LORITE et al., 1998), which consists of measuring of the amount of released tyrosine from muscle tissue after adding cycloheximide and a 2-h incubation. The protein degradation rate was expressed as the arbitrary fluorescence unit of released tyrosine content (WAALKES; UDENFRIEND, 1957) per milligram of muscle protein per hour.

## 2.6. Enzymatic Assays

After euthanasia, the gastrocnemius muscle was removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Muscle samples were homogenised in phosphate buffer saline (PBS) and 0.1% Triton X-100 and centrifuged at 12000 g. The supernatant was used to analyse protein content (BRADFORD, 1976), and muscle enzymatic activity assays for calpain (BUROKER-KILGORE; WANG, 1993), cathepsin H (BARRETT, 1980), and chymotrypsin activity (ORINO et al., 1991) were used as previously described.

## 2.7. Western Blot Assay

The gastrocnemius muscle samples were homogenised in buffer containing 20 mM Tris, 1 mM DTT, 2 mM ATP, and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , centrifuged at 12000 g, and total protein content was assessed using the Lowry method (LOWRY et al., 1951). Muscle samples (60  $\mu\text{g}$  of protein) were analysed using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% or 12%) and transferred to a 0.45- $\mu\text{m}$  pore size nitrocellulose membrane, which was blocked with skim milk (5%) for 1 h. Proteins were probed with primary antibodies GAPDH (SC47724) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); 20S (PW8195), 19S (PW9265), and 11S (PW8185) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA); PI3K (4292), phospho-PI3K (4228), mTOR (2972), phospho-mTOR (2971), p70S6K (9202), phospho-p70 S6KThr421/Ser424 (9204), 4E-BP1 (9452), phospho-4E-BP1Thr70 (9455), and eIF4G (2498)

(Cell Signalling, Danvers, MA USA); and secondary antibodies goat anti-rabbit (7074) and horse anti-mouse (7076) (Cell Signalling). The Western blot band images were captured using the Alliance 2.7 (UVITEC, Cambridge, UK) and quantified using UViband-1D (UVITEC), and protein expression was normalised using GAPDH as a loading control.

## 2.8. Statistical Analyses

For multiple group comparisons, the data were evaluated using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test (Graph Pad Prism software, version 5.0, San Diego, CA, USA) (GAD, S. C.; WEIL, 1994). For direct comparisons between two groups (especially between groups from different dams), the data were analysed using the Student's *t*-test (GAD, S. C.; WEIL, 1994). The results are expressed as the mean and standard error of the mean (SEM). Results were considered to be significant when the P-value was  $< 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Maternal and Offspring Weight Gain, Food Intake, and Cachexia Indicators after Tumoral Evolution

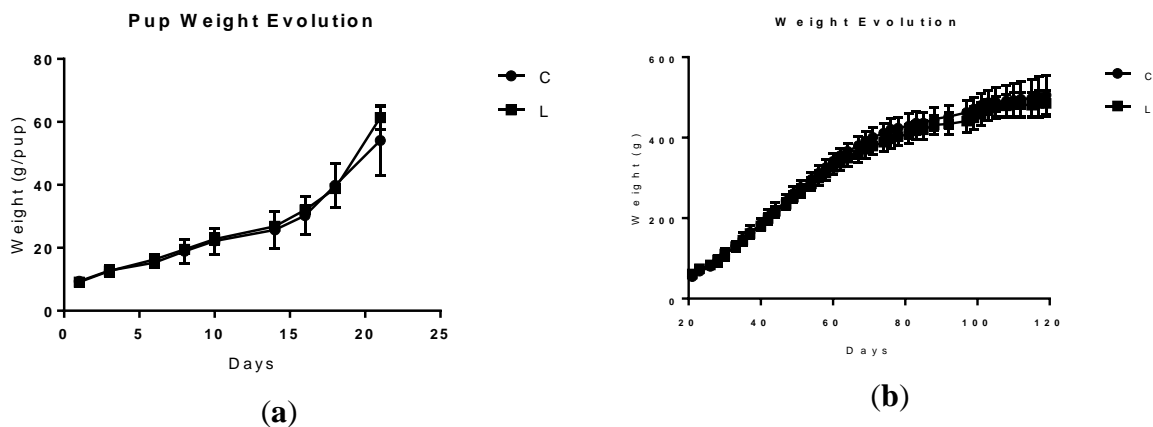
In the gestation and lactation periods, there were no differences between DC and DL in terms of the initial and final food intake and weight gain (Table 1). The litter weight increase during the lactation period was also not different between the groups (Figure 2A), and this trend continued until adulthood. After weaning (21 days old) and at adulthood (before tumour inoculation; 120 days old), the two groups had similar body weights (Figure 2B). Thus, the only difference between the groups was the diet administered during the gestation and lactation periods.

All groups had similar body weight, body weight gain, and food intake at the time of tumour inoculation (measurement obtained on day 120 of the experiment; Table 2). The carcass weights were not different between the control groups (C and L) on the euthanasia day (day 141; Table 2). As expected after tumour growth, the tumour-bearing groups had a lower body weight gain ( $W < C$ ,  $P = 0.0294$ ;  $WL < L$ ,  $P < 0.0001$ ; Table 2) and decreased food intake ( $W < C$ ,  $P < 0.0001$ ;  $WL < L$ ,  $P < 0.0001$ ; Table 2) compared with control groups. Despite having a tumour, the WL group had a higher final food intake compared with the W group ( $P = 0.0171$ ; Table 2).

**Table 1.** Dam food intake and weight gain during the gestation and lactation periods

Parameters		DC	DL
Gestation	Initial Food Intake (g)	18,52 $\pm$ 3,14	18,02 $\pm$ 0,53
	Final Food Intake (g)	19,12 $\pm$ 4,14	15,12 $\pm$ 2,39
	Body Weight Gain (g)	125,30 $\pm$ 13,35	97,33 $\pm$ 12,44
Lactation	Initial Food Intake (g)	20,43 $\pm$ 1,53	20,36 $\pm$ 3,50
	Final Food Intake (g)	28,86 $\pm$ 3,37	34,29 $\pm$ 0,75
	Body Weight Gain (g)	42,67 $\pm$ 6,69	33,33 $\pm$ 3,84

Dams' food intake and weight gain during the gestation and lactation periods. DC, dams supplemented with control diet during the gestation and lactation period (n = 3); DL, dams supplemented with leucine-rich diet during the gestation and lactation period (n = 3). Dams' food intake was the average measurement of the food weight offered per day (calculated as the difference of offered food minus the remaining food). Dam body weight gain was calculated using the difference between final body weight at the time of birth and initial body weight at mating. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. The data were analysed using a *t*-test.



**Figure 2.** Offspring body weight evolution. **(a)** Pup weight evolution (g) during lactation until the weaning period (21 days old; litter size was adjusted to 8 pups/dam). **(b)** Individual offspring weight evolution (g) after weaning until adulthood (before tumour inoculation; 21 to 120 days of life). C, offspring from a dam that was fed a control diet during its lifetime (n = 8); L, offspring from a dam fed the maternal leucine-rich diet and control diet after weaning (n = 8). The data were analysed using a *t*-test.

The tumour weight showed no differences between the groups (Table 2) and the muscle weight decreased in the W group ( $P = 0.0089$ ; Figure 3A), but was preserved in the WL group, in which the dams received the leucine-rich diet during the gestation and lactation periods.

The effects of tumour growth led to a decreased serum total protein ( $W < C$  and  $WL < L$ ,  $P < 0.0001$ ) and albumin ( $W < C$ ,  $P = 0.0004$ ;  $WL < L$ ,  $P = 0.0002$ ) content in the W and WL groups (Table 2). The ratio between albumin and globulin content significantly decreased only in the W group ( $P = 0.0072$ ) and the serum triglyceride content increased in the W group ( $P = 0.0005$ ). The WL group showed no differences in these parameters compared to the L group. The serum cholesterol decreased in both tumour-bearing groups ( $W < C$ ,  $P = 0.0382$ ;  $WL < L$ ,  $P = 0.0035$ ; Table 2).

**Table 2.** Tumour growth affected body weight, food intake, and serum parameters in the tumour-bearing groups.

Morphometric and serum parameters	C	W	L	WL
Initial body weight (g)	514,80 ± 14,13	531,39 ± 21,66	518,06 ± 10,55	497,35 ± 10,89
Carcass weight (g)	528,41 ± 15,20	458,47 ± 21,21 <sup>a</sup>	524,00 ± 12,06	414,31 ± 13,45 <sup>c</sup>
Body weight gain (%)	104,56 ± 3,99	88,10 ± 1,78 <sup>a</sup>	101,24 ± 1,96	83,64 ± 3,50 <sup>c</sup>
Initial food intake (g)	21,48 ± 1,24	22,14 ± 1,03	23,63 ± 3,04	22,96 ± 1,23
Final food intake (g)	20,52 ± 1,27	8,46 ± 1,08 <sup>a</sup>	18,08 ± 0,24	12,60 ± 0,71 <sup>b, c</sup>
Tumour weight (g)	-	71,70 ± 6,94	-	80,92 ± 5,54
Total Protein (g/dL)	5,82 ± 0,28	4,32 ± 0,12 <sup>a</sup>	5,14 ± 0,18	4,25 ± 0,07 <sup>c</sup>
Albumin (g/dL)	3,28 ± 0,07	2,81 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,19 ± 0,07	2,80 ± 0,06 <sup>c</sup>
A/G ratio	1,43 ± 0,07	1,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,01	1,82 ± 0,09
Triglycerides (mg/dL)	118,89 ± 4,95	165,39 ± 10,20 <sup>a</sup>	125,18 ± 5,41	154,50 ± 8,01
Cholesterol (mg/dL)	67,05 ± 2,65	58,91 ± 0,58 <sup>a</sup>	67,69 ± 2,14	57,28 ± 1,43 <sup>c</sup>

Legend: C, Control); W, Tumour-bearing animals); L, Group without tumour and with a maternal leucine-rich diet; WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet. Initial day corresponds to day 120 (the age of the animals before tumour inoculation); final day (day 141) corresponds to after 21 days of tumour growth, which is the date of the euthanasia. For details, see the Materials and Methods section. Values are presented as the mean ± SEM (n = 7, minimal animals per group). The data were analysed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni test to evaluate comparisons among groups. The analysis between the two tumour-bearing groups was conducted using a *t*-test. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , compared with the C group; <sup>c</sup>  $P < 0.05$ , compared with the L group.

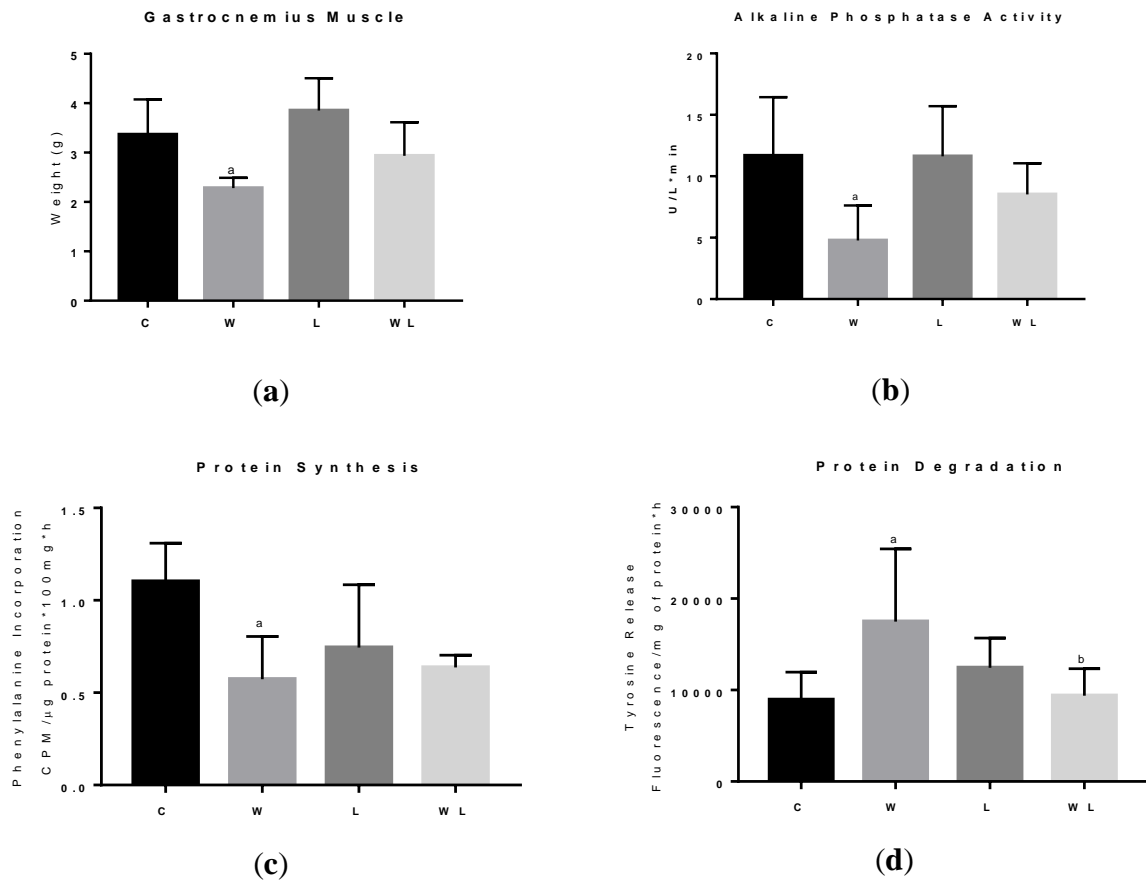
### 3.2. Maternal Leucine-rich Diet Attenuates the Effects of Tumour Evolution Over Muscle Protein Synthesis and Degradation

Alkaline phosphatase activity was significantly reduced only in the W group ( $W < C$ ,  $P = 0.0086$ ) (Figure 3B), whereas in the WL group it did not change, indicating less impact on tumour growth in the muscle of rats in the tumour-bearing group with maternal leucine supplementation. Additionally, because we found differences between the loss of muscle mass in the tumour-bearing groups, protein synthesis and protein degradation were evaluated. The tumour-bearing group (W) had lower phenylalanine incorporation ( $W < C$ ,  $P = 0.0048$ ) (Figure 3C) and increased tyrosine release ( $W > C$ ,  $P = 0.0104$ ) (Figure 3D), which suggested that there was a decrease in the synthesis process and increased muscle degradation, respectively. For the tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet (WL), muscle protein synthesis (Figure 3C) and degradation (Figure 3D) showed no differences from the L group, and despite tumour growth, the WL group had a significantly different level of tyrosine release compared to the W group ( $P = 0.0210$ ). These data are in accordance with the preservation of muscle weight in this group (Figure 3A).

### 3.3. Proteasome 20S Subunit Expression and Calpain and Cathepsin Activities Decreased in the rats with Maternal Leucine Supplementation

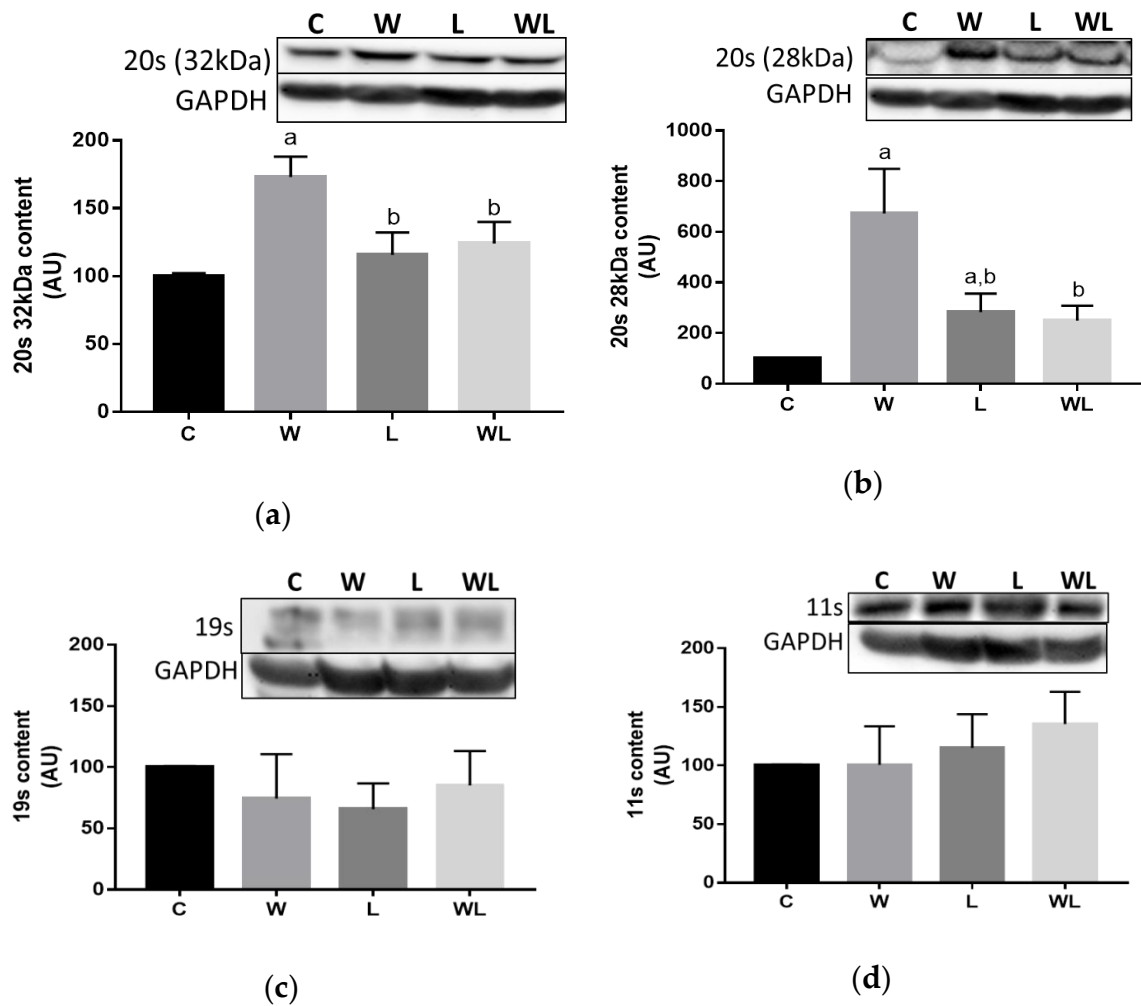
The relationship between protein degradation and the proteasome subunits 20S and 19S and the 11S regulatory particle were investigated (Figure 4). The 19S, and 11S expression (Figure 4 C, D) was not different among the groups. When we investigated the 20S subunit (32 and 28 kDa) (Figure 4A and B), and we found an increase in the W group compared to the C group ( $W > C$ ,  $p < 0.0001$  for 32 kDa; and for 28 kDa  $W > C$ ,  $p < 0.0001$ ,  $L > C$ ,  $p = 0.0236$ ,  $C = WL$ ,  $p = 0.0547$ ). Additionally, maternal leucine supplementation led to modulation of the damage effect because the 20S subunit (32 and 28 kDa) expression in the WL group was lower than that in the W group ( $WL < W$ ,  $p = 0.0017$  and  $p = 0.0004$ , respectively).

We evaluated the activity of cathepsin H, calpain, and chymotrypsin-like (Figure 5) enzymes related to muscle protein degradation. The W group had higher calpain ( $p = 0.0104$ ; Figure 5A) and cathepsin H ( $p = 0.0306$ ; Figure 5B) activities compared to the C group, indicating the impact on the calcium-dependent proteolysis pathway and lysosomal degradation, respectively. No differences were found between maternal leucine supplementation groups. For chymotrypsin-like activity (Figure 5C) no differences were found among the groups, in this protease related to the proteasome activity

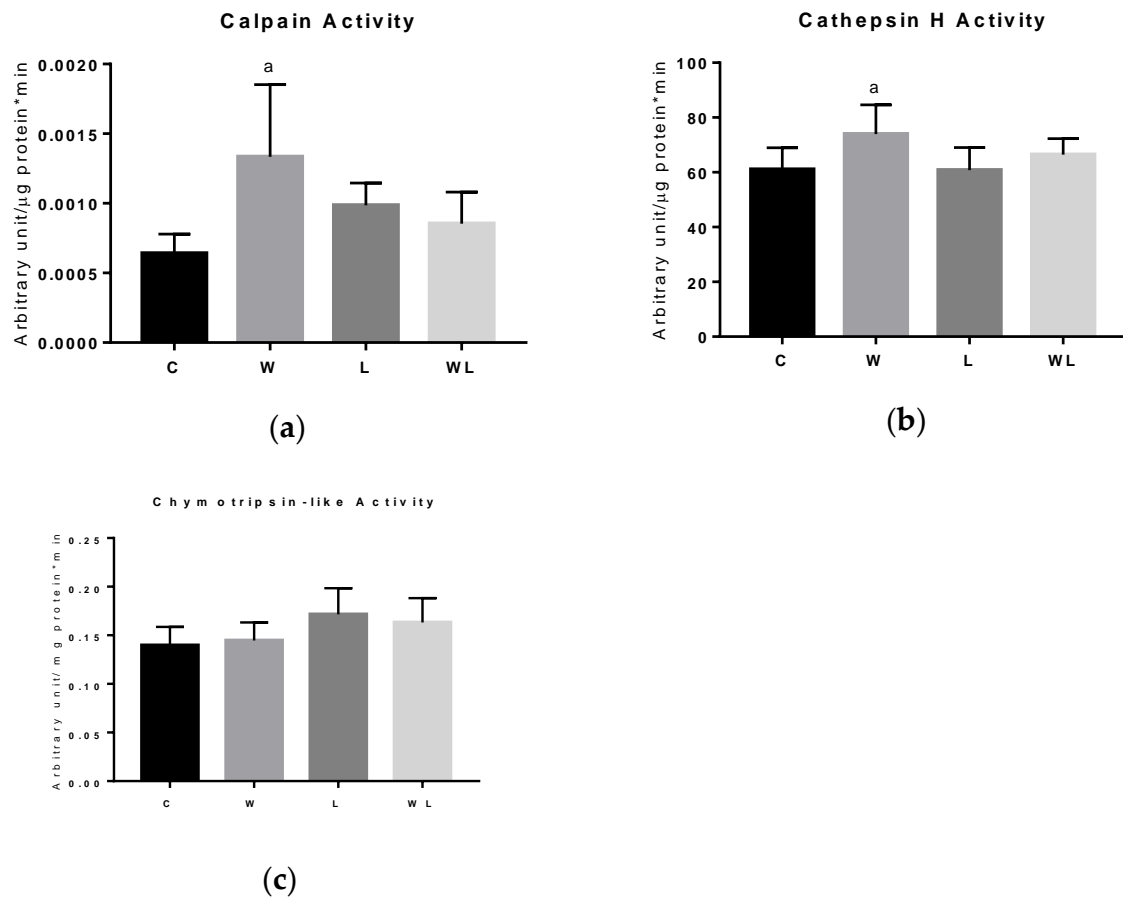


**Figure 3.** Tumour growth affected muscle protein synthesis and degradation and the phosphatase alkaline activity. **(a)** Muscle weight (g); **(b)** alkaline phosphatase activity, expressed as U/L\*min; **(c)** muscle protein synthesis, expressed by the phenylalanine incorporation, CPM/ $\mu$ g protein\*100 mg\*h; **(d)** muscle protein degradation, expressed by tyrosine release, fluorescence/mg of protein\*h. C, Control; W, Tumour-bearing animals; L, Group without tumour with a maternal leucine-rich diet; WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet. For details, see the Materials and Methods section. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.  $n = 7$ , minimal animal per group. The data were analysed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni test to evaluate comparisons among groups. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , for comparison with the C group; <sup>b</sup>  $P < 0.05$ , for comparison with the W group.





**Figure 4.** Tumour growth affected the ubiquitin-proteasome pathway. Proteasome subunits contents (a) 20S (32kDa); (b) 20S (28kDa); (c) 19S; and (d) 11S. The results represent bands that were quantified and normalised by GAPDH expression. Western blot images are representative of the total results obtained. Values are expressed as the relative percentage in the C group, which was set equal to 100%. C, Control ; W, Tumour-bearing animals; L, Group without tumour with a maternal leucine-rich diet ; WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet. n= 6, minimal animals per group. For details, see the Materials and Methods section. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. The data were analysed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni test to evaluate comparisons among groups. <sup>a</sup> P < 0.05, for comparison with the C group; <sup>b</sup> P < 0.05, for comparison with the W group; <sup>c</sup> P < 0.05, for comparison with the L group.

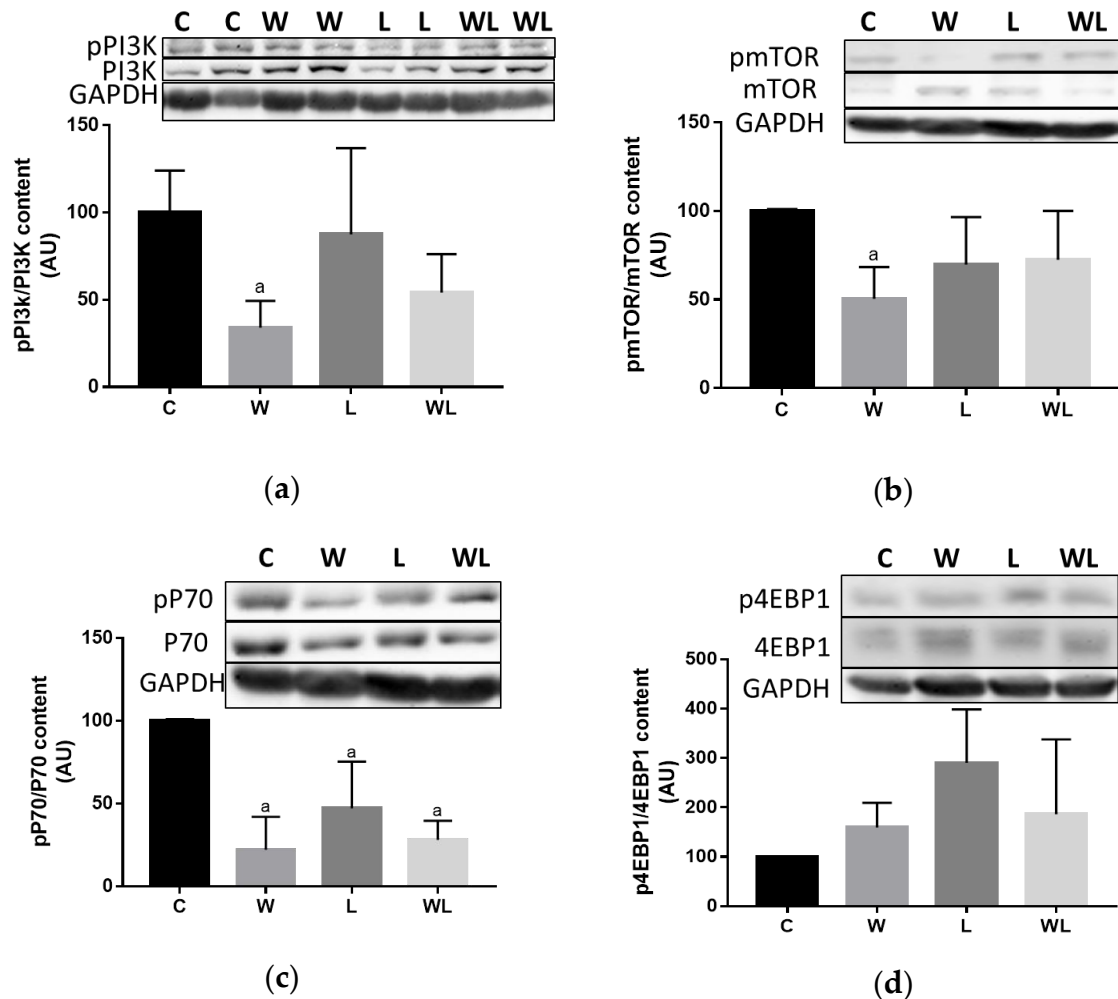


**Figure 5.** Tumour growth affected the muscle lysosomal and calcium-dependent proteolytic pathways. Enzyme activities related to the following protein degradation pathways were assessed: **(a)** calpain; **(b)** cathepsin H; and **(c)** chymotrypsin-like activities. The results are expressed as arbitrary unit / $\mu$ g (or mg) protein\*min. C, Control; W, Tumour-bearing animals; L, Control group with a maternal leucine-rich diet ; WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet . For details, see the Materials and Methods section. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.  $n = 7$ , minimal animals per group. The data were analysed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni test to evaluate comparisons among groups. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , for comparison with the C group

### 3.4. Maternal Leucine-rich Diet Changed the mTor Muscle Protein Synthesis-related Pathway

We investigated the mTOR pathway and the pPI3K/PI3K ratio was reduced in the W group compared to the C group ( $p = 0.0356$ ; Figure 6A), but no differences were found between the L and WL group. The pmTOR/mTOR ratio decreased only in the W group (Figure 6B) (C vs W,  $p = 0.0481$ ) and the supplemented groups showed no difference. The

pP70S6k/P70S6K ratio (Figure 6C), a downstream target of mTOR, showed a decrease in the W group compared to the C group ( $p = 0.0056$ ), and the L group showed lower activation compared to the C group ( $p = 0.0410$ ), but there was no difference between the L and WL groups (Figure 6C). Additionally, there was no difference in the p4EBP1/4EBP1 ratio (Figure 6D), another downstream protein of the mTOR pathway, among the groups.



**Figure 6.** Tumour growth affected proteins related to the mTOR pathway. (a) pPI3K/PI3K; (b) pmTOR/mTOR; (c) pP70S6k/P70S6K; and (d) p4EBP1/4EBP1 ratios (percentage of arbitrary unit (AU)). The results represent bands that were quantified and normalised to GAPDH expression. Western blot images represent all analyses in the different groups. C, Control ; W, Tumour-bearing animals ; L, Group without tumour with a maternal leucine-rich diet ; WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet. For details, see the Materials and Methods section. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$ . The data

were analysed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni test to evaluate comparisons among groups. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , for comparison with the C group.

#### 4. Discussion

In this study, we investigated a preventive approach using a maternal leucine-rich diet to reduce the cancer-induced loss of muscle mass, modulating the muscle protein synthesis and degradation in adult offspring. The maternal dietary intervention during gestation and lactation periods was shown to be preserved throughout the lifetime of the offspring (MATHIAS et al., 2014). We evaluated the influence of the maternal diet on adulthood because the parameters evaluated for the dam and the weight increase in the offspring showed that the maternal diet did not affect these morphometric parameters. Additionally, the maternal leucine-rich diet did not affect tumour size, which is in accordance with previous studies (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; MIYAGUTI; DE OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2018), but it minimised the cancer cachexia-induced damage to the skeletal muscle.

Because anorexia is related to weight loss and cachexia progression, an improvement in this parameter combined with reduced muscle wasting could lead to a better response to treatment (FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006; TISDALE, 2002a). We reported here that the increase in food intake in the WL group compared to the group without a maternal supplementation (W) could be a positive maternal influence. Additionally, we have shown that muscle tissue can be preserved by the maternal diet effect. Thus, our results show that a maternal diet supplemented with leucine can modulate the cancer cachexia-induced damage to this group, which is an important finding in this study.

This cachexia experimental model is associated with damage processes in the rats, such as altered serum parameters and deep muscle wasting (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; VIANA et al., 2016). In this study, we verified that the maternal diet could be an alternative to minimise the cancer-induced damage in adult offspring rats, such as an improvement in triglyceride levels and the albumin-to-globulin ratio, which were improved by maternal leucine as supplementation. Additionally, decreased muscle alkaline phosphatase activity was likely related to impairment of muscle cell function, which could be linked to decreased muscle protein synthesis that is associated with increased muscle spoliation (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; MARTINS; NEGRÃO; HIPÓLITO-REIS, 2001a), as seen in the W group and corroborated by the decreased muscle weight. As a positive effect of maternal diet, the muscle alkaline phosphatase activity remained similar regarding protein

synthesis and lower protein degradation in the WL adult-offspring, which were associated with similar muscle weight, without changing the tumour weight. Thus, the maternal leucine-rich diet could influence muscle protein turnover, as a preventive approach.

Focusing on muscle protein signalling, the mTOR pathway is an important pathway that is related to control of protein synthesis and is impacted by cancer cachexia (SAXTON; SABATINI, 2017; TISDALE, 2009). Consistent with this, cancer evolution inhibits the mTOR pathway (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; TISDALE, 2009), as shown here in the W group, and these results support decreased protein synthesis, increased protein degradation, and reduced muscle weight. However, the maternal leucine diet supplementation scheme improved this mTOR pathway, not changing the pmTOR/mTOR ratio; this reflects the maintenance of the pP70S6k/P70S6K ratio, which could be related to less muscle wasting. Thus, the maternal leucine-rich diet modulated the mTOR signalling, which seemed to be a preventive effect.

In parallel, the skeletal muscle proteolysis is a key point to understand cachexia progression. Skeletal muscle has three main degradation pathways for protein breakdown, which are ubiquitin-proteasome, lysosomal and calcium-dependent pathways (PORPORATO, 2016), and they are mainly altered in this condition. In murine models, the ubiquitin-proteasome degradation has been widely studied as the most important mechanism in muscle atrophy (LECKER et al., 1999; TISDALE, 2002a, 2009). In this study, we found enhancement only in the 20S subunit, especially related to the proteolytic activity (20S–28kDa subunit) in the W tumour-bearing group, but not on chymotrypsin-like enzyme activity, or in the proteasome subunits (19S and 11S). However, Tardif and colleagues [60] suggested that the lysosomal system, which includes cathepsin H, can be upregulated in patients with cachexia, which is suggested to be the promoter of the skeletal muscle proteolysis (OP DEN KAMP et al., 2013; TARDIF et al., 2013). Similarly, calpain proteases have also been proposed to initiate the skeletal muscle degradation process, but this mechanism needs to be better investigated (COSTELLI et al., 2005). Confirming these findings, the Walker-256 evolution, as an experimental model of cachexia, led to muscle wasting that occurred via the lysosomal and calcium-dependent pathways (increased cathepsin H and calpains activities) only in the W group, showing the effect of the cachexia in this group. Conversely, we have shown that a maternal leucine-rich diet has preventative roles, minimising this cancer cachexia-induced injury in the WL adult offspring, which likely contributed to less muscle protein degradation. These data are in accordance with other

studies that use leucine as a treatment (SALOMÃO et al., 2010; VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2004), but here we also presented data related to prevention.

In summary, the maternally supplemented leucine group had less cachexia-induced muscle wasting compared to the control maternal diet group. This finding can be related to the muscle protein synthesis and degradation balance that could result in positive net protein metabolism, thus preserving muscle mass. Additionally, food intake was increased in this group, showing another positive influence of the maternal diet. Therefore, the leucine-rich diet, when maternally administered, showed benefits such as a preventive strategy against cancer cachexia-induced muscle loss in adult offspring tumour-bearing rats. This study had some limitations, including the length and size of the experiment. Thus, we decided to test one previously determined leucine dose that was usually used in treatment approaches, to demonstrate here that the maternal diet with leucine can modulate cancer cachexia-induced damage, specifically in the gastrocnemius skeletal muscle.

## 5. Conclusions

In conclusion, the present study provides innovative findings about the preventive effects of a maternal leucine-rich diet on maintaining of muscle mass, improving food intake, maintaining muscle protein synthesis, and decreasing muscle protein spoliation by reducing the activity of proteolysis pathways and preserving mTOR via in skeletal muscle in adult offspring tumour-bearing rats. The results from this study have shed light on new avenues for further studies, which are now ongoing in our laboratory, to increase our knowledge about the epigenetics mechanisms produced by a maternal leucine-rich diet.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.A.S.M.; methodology, N.A.S.M., S.C.P.O. and M.C.C.G.; validation, N.A.S.M., S.C.P.O. and M.C.C.G.; formal analysis, N.A.S.M., S.C.P.O. and M.C.C.G.; investigation, N.A.S.M., S.C.P.O. and M.C.C.G.; data curation, N.A.S.M., S.C.P.O. and M.C.C.G.; writing, original draft preparation, N.A.S.M., S.C.P.O. and M.C.C.G.; supervision, N.A.S.M., and M.C.C.G.M.; funding acquisition, M.C.C.G.M.

**Funding:** This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), grant number #2014/13334-7, #2017/02739-4; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), grant number #302524/2016-9.

### CAPÍTULO III

**Análise metabolômica de soro, por  $^1\text{H}$  NMR, mostrou as alterações nas respostas metabólicas influenciadas pela suplementação nutricional materna com leucina na prole de ratos adultos portadores de tumor.**

*(“Serum  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics reveals metabolic changes led by a maternal leucine-rich diet in adult-offspring tumour bearing rats.”)*

**Este trabalho é parte do artigo que será submetido na revista “*Nutrition & Metabolism*”, e foi realizado em parceria com o Laboratório Nacional de Biociências (LnBio) para uso do equipamento de ressonância magnética nuclear e também com o Laboratório de Química Biológica (Instituto de Química/UNICAMP) da Profa. Dra. Ljubica Tasic, para o tratamento de dados e análises quimiométricas. A redação deste trabalho também será apresentada em inglês.**

#### **Resumo do Capítulo III**

Introdução: A caquexia associada ao câncer leva a uma intensa alteração metabólica, impactando no armazenamento e disponibilização de energia do hospedeiro. Estudos prévios mostraram que o tumor Walker 256 aumenta o processo glicolítico, incluindo o ciclo fútil de energia que desvia para o crescimento do tumor e aumenta o gasto energético do hospedeiro e que a dieta rica em leucina pode modificar este metabolismo preservando o armazenamento de energia. Levando em consideração as alterações metabólicas consequentes do desenvolvimento tumoral e que modificações nutricionais da dieta materna podem refletir nas respostas metabólicas da prole adulta, neste estudo foi avaliada a suplementação nutricional materna com leucina na modificação do metabolismo da prole frente às respostas ao crescimento tumorais, procurando encontrar os metabólitos chaves responsáveis por tal diferenciação.

Métodos: Foram utilizadas ratas Wistar grávidas submetidas à dieta controle ou dieta rica em leucina (3%), durante o período de gestação e lactação. Após desmame, os machos das proles foram submetidos à dieta controle até a vida adulta. Aos 120 dias de idade foi realizada a inoculação tumoral, delineando os seguintes grupos (n=7-8 por grupo): C,

grupo controle; W, grupo portador de tumor; L, grupo suplementado com dieta materna rica em leucina; WL, grupo portador de tumor suplementado com dieta materna rica em leucina. Foi avaliado o metabolismo sérico desses animais, por  $^1\text{H}$  RMN. Os espectros foram obtidos utilizando o aparelho *Varian Inova NMR* operando na frequência de 500 MHz, temperatura constante e 298 *scans*, com pré-saturação com água. As análises quimiométricas foram realizadas com auxílio do software *MetaboAnalyst*, a partir dos espectros tratados no software Mestre Nova e normalizados por PQN. Foi realizada análise de PLS-DA, que mostrou as diferenças entre os grupos e também o *VIP score*, sinalizando os metabólitos responsáveis por tal diferenciação.

Resultados: Através da análise do PLS-DA, grupos experimentais foram todos separados em relação ao seu metabolismo. Os dados obtidos tanto em função do crescimento tumoral, quanto à dieta materna rica em leucina, mostraram alterações das respostas metabólicas da prole que perduraram até a vida adulta (grupos L e WL). Os principais metabólitos com diferenças significativas avaliados pelo *VIP score* foram relacionados à alta divisão celular (uracil e citidina), principalmente do tecido tumoral, em ambos os grupos portadores de tumor e à espoliação, principalmente do tecido proteico, sofrida pelos animais portadores de tumor (4 amino-hippurato, glutamina, lisina), podendo estas mudanças estarem correlacionadas com a melhora nas respostas encontradas no Capítulo II do grupo portador de tumor suplementado maternalmente com leucina (WL).

Conclusões: A dieta rica em leucina quando administrada durante a gestação e lactação modifica a resposta metabólica da prole até a vida adulta, inclusive quando associada à caquexia, impactando metabólitos que podem estar relacionados a vias que se relacionam com as melhores respostas deste grupo frente à espoliação provocada por esta síndrome.

## 1. Hypothesis

Cancer cachexia syndrome leads to an intense metabolic change in the host, especially related to energy storage and mobilisation. Previous studies showed that the Walker 256 tumour increases the glycolytic process including a futile cycle of energy diverting to tumour growth and increasing the host expenditure and a leucine rich diet can modify the host metabolism preserving the energy storage. A maternal supplemented nutritional scheme can modify the foetal gene expression impacting in differences in the offspring metabolism. Thus, this study aimed study if a maternal leucine-rich diet is able to modulate the serum metabolic profile of the adult-offspring tumour-bearing rat showing differences in metabolites related to



the benefits presented in our previous studies related to an improvement of liver function and muscle protein turnover.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals and Experimental Procedure**

The experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Institute of Biology at the University of Campinas (protocol number: #4224-1), and was followed in accordance to the current ethical standards of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (VALE; STEWART; TIERNEY, 2005).

Adults Wistar rats, 90 days old, were obtained from the Multidisciplinary Centre for Biological Research at the University of Campinas and were housed in individual cages at the experimental room located in the Laboratory of Nutrition and Cancer. The environmental conditions were controlled: 12/12hs light and dark cycle; humidity 50-60% and temperature  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . The animals conditions and morphometric parameters were monitored daily and given free access to food and water.

The rats were mated (2 females:1 male), following the harem method (BAKER, 1979). After pregnancy detection, the dams rats were separated from males and were distributed into two groups according to the diets administrated: dams subjected to control diet (n=3) and dams subjected to leucine-rich diet (n=3). Throughout gestation (21 days) and lactation (21 days) periods, the dams received the indicated diets. The offspring were reduced to 8 pups per litter.

After weaning, the male offspring (n=7-8 per group) started to receive the Control diet. The adult offspring, 120 days old, were distributed into 4 groups according to the tumour implant and maternal diet, outlining the following groups:

C; Control; fed a Control diet throughout the intrauterine, lactation and adulthood, without tumour;

W; Tumour-bearing animals; fed a Control diet throughout the intrauterine, lactation and adulthood;

L; Group without tumour from a maternal leucine-rich diet; Leucine-rich diet was given throughout the intrauterine and lactation period, then the weaning rats fed a control diet until adulthood;

WL; Tumour-bearing group from a maternal leucine-rich diet; Leucine-rich diet was given throughout the intrauterine and lactation periods, then the weaning rats fed a control diet until adulthood.

The tumour-bearing rats received tumour implant by subcutaneous injection of approximately  $3 \times 10^6$  viable Walker-256 tumour cells in the right flank, as previously described in our studies (CRUZ; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2017; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2016). After 21 days of tumour evolution, all the animals were euthanised by decapitation to collect blood samples which were centrifuged at  $1200 \times g$  for 15 min; the serum was collected and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The left gastrocnemius muscles were resected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

## 2.2. Diet

The diets were prepared in accordance with the American Institute of Nutrition (AIN-93; (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993)). The Control diet contained 18% protein, containing 1.6% of L-Leucine as described by the AIN-93 semi-purified diet, and the Leucine-rich diet had the same composition as the Control diet plus 3% of L-leucine (totalising 4.6% of L-leucine in total). The amount of L-leucine was based on our previous experimental study (MIYAGUTI; DE OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2018). All diets were prepared in the Laboratory of Nutrition and Cancer at the University of Campinas.

## 2.3. Sample preparation and $^1\text{H}$ NMR data acquisition

Plasma samples (0.5 mL) were filtered through a 3 kDa membrane, following the manufacturer instructions (Microcon YM-3 column; Amicon Ultra, Sigma-Aldrich). The filtered serum obtained (0.2 mL) was diluted in an aqueous solution (0.6 mL) containing 10 % (v/v) deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ , 99.9 %; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, USA), phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.5 mM TMSP-d<sub>4</sub> (3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeutero- propionic acid from Sigma-Aldrich), then transferred to a 5-mm NMR tube (Norell Standard Series 5 mm, Sigma-Aldrich) for immediate acquisition.

The  $^1\text{H}$  NMR spectra acquisition was performed using a Varian Inova NMR spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) equipped with a triple resonance probe and operating at a  $^1\text{H}$  resonance frequency of 500 MHz and constant temperature of 298 K. A total of 256 free induction decays (FID) were collected with 32K data points over a spectral width of 16 ppm. A 1.5-s relaxation delay was incorporated between scans, during which a continual water presaturation radio frequency (RF) field was applied.

## 2.4. Spectral Data Processing and Multivariable Statistical Analysis

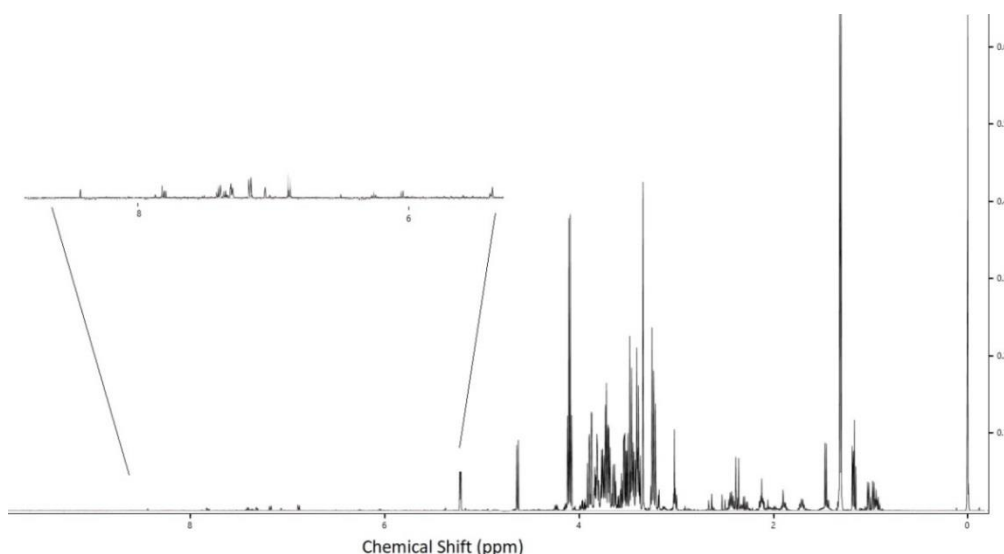
The spectral data obtained were manually phased corrected and referenced to the methyl doublet signal of lactate ( $\delta$  1.33) using MestReNova v.8.1.2 software (Mestrelab Research S.L.). Residual water signals ( $\delta$  4.7 – 5.0) and peak-free regions were removed from further analysis. The remaining spectra ( $\delta$  0.4-9.0) were binned into bucketed data with widths of 0.005 ppm.

Chemometric and statistical analyses were performed using the *MetaboAnalyst* (v3.0) (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007; XIA et al., 2015). Data normalisation was carried out to take sample concentrations variations into consideration using the *probabilistic quotient normalisation* (PQN) method (DIETERLE et al., 2006). The data were first analysed by *principal component analysis* (PCA) to extract and display the systematic variation in the data and to acquire an overview by presenting trends, groupings, and potential outliers (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007). In addition, to characterise intergroup differentiation, *partial least squares-discriminant analysis* (PLS-DA) was carried out. A cross-validation (LOOCV) method with accuracy performance measure was conducted to evaluate the performance of PLS-DA, where  $R^2$  and  $Q^2$  were calculated as the goodness of fit and the predictive capability of the model, respectively. The significance of variables was evaluated using the variable importance in the projection (VIP) method. The corresponding metabolites in serum found in the VIP projection were identified by consulting the literature, Chenomx Software database and The Human Metabolome Database (HMDB). To analyse the difference among samples, the relative metabolite abundance was quantified from the comparison of the internal standard (TSP) concentration in the Profiler Chenomx module, and then subjected to statistical analysis using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test (Graph Pad Prism software, version 5.0, San Diego, CA, USA) (GAD, S. C.; WEIL, 1994). The results are expressed as the mean and standard error of the mean (SEM). Results were considered to be significant when the  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Metabolic changes in Serum Samples.

Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra obtained from a serum sample from Control groups is showed in Figure 1. The PLS-DA was applied to discriminate the differences between the groups and to identify the “metabolites/regions” responsible for this variations.



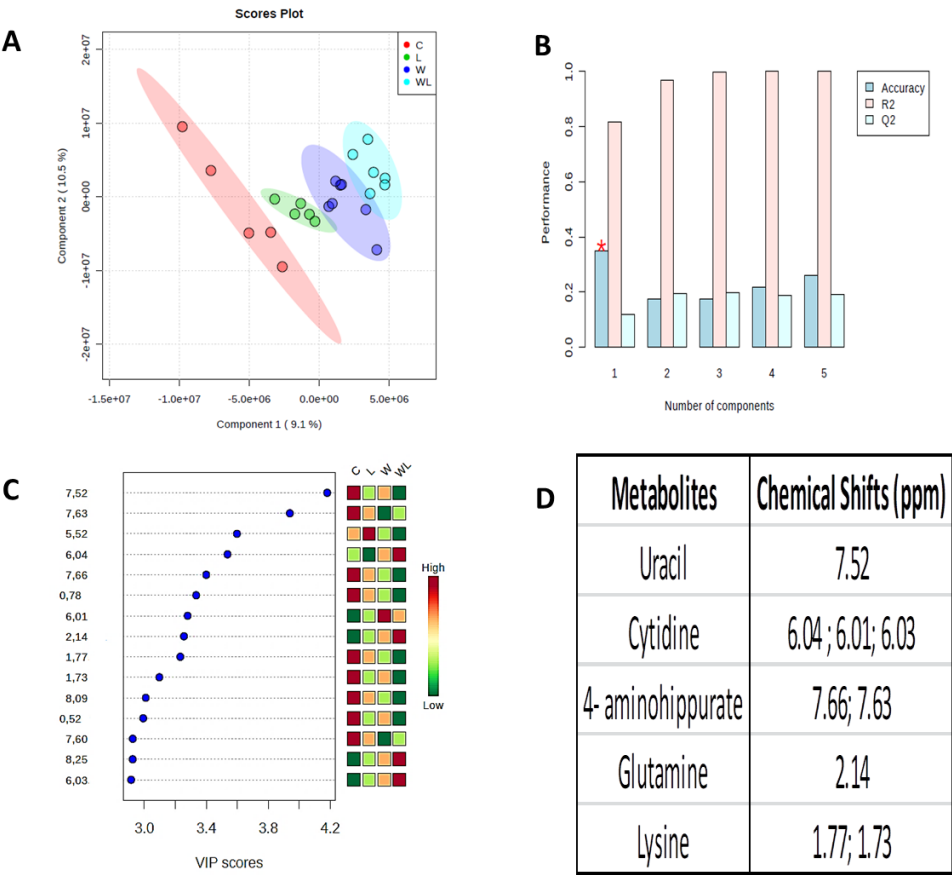
**Figure 1.** Serum  $^1\text{H}$  NMR representative spectra (0 - 8.5 ppm) for the Control group.

PLS-DA model showed a clear differentiation between C, W, L, WL groups as represented in PLS-DA score plot (Figure 2A), which was validated by cross-validation (Figure 2B, Accuracy = 0.348 ,  $R^2=0.815$  ,  $Q^2=0.119$  ).

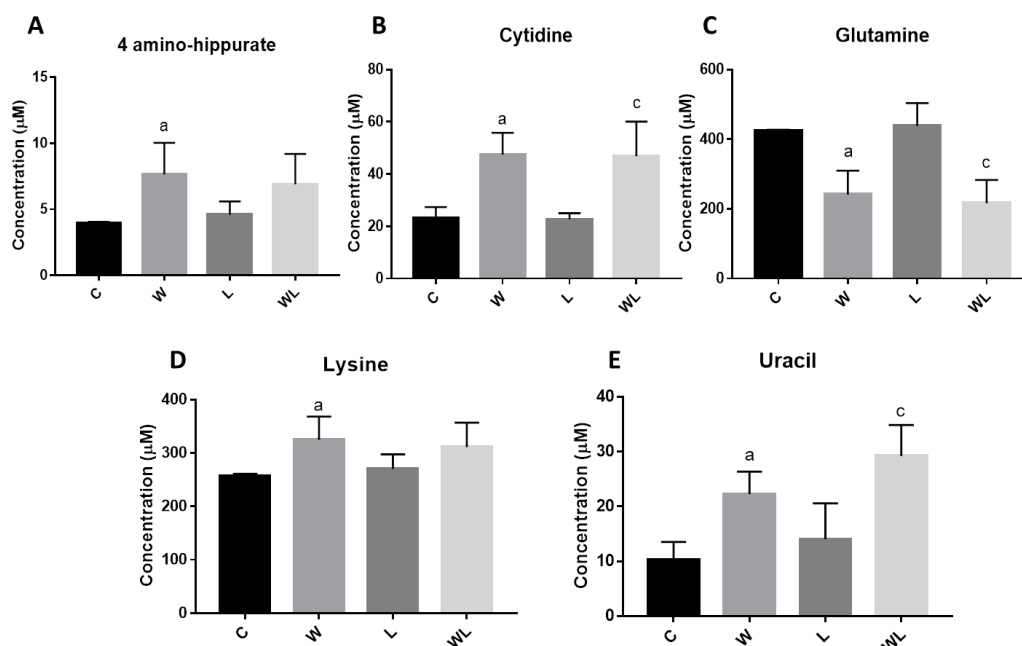
The metabolites responsible for this separation, obtained from the VIP score of PLS-DA model analysis (Figures 3C and 3D), were assigned by comparing their chemical shifts and spectral peak multiplicities with Chenomx Software, literature data and spectra of standards acquired in Human Metabolome Database.

The key metabolites responsible for the group differentiation selected of the VIP score were: uracil ( $\delta$  7.52); cytidine ( $\delta$  6.04;  $\delta$  6.01 and 6.03); 4-amino-hippurate ( $\delta$  7.66 and  $\delta$  7.63); glutamine ( $\delta$  2.14); lysine ( $\delta$  1.77 and  $\delta$  1.73) (Figure 3). For cytidine and uracil were found an increase in the concentration of these metabolites in both tumour bearing groups (W and WL) when compared to their controls (cytidine: W vs C,  $P=0.0005$ ; L x WL,  $P=0.0012$ ; uracil: W vs C,  $P=0.0066$ ; L x WL,  $P=0.0007$ . Figures 3B and 3E). On the contrary, for glutamine, both tumour bearing groups (W and WL) presented a decrease of this metabolite when compared to the controls (W vs C,  $P=0.0005$ ; L x WL,  $P<0.0001$ , Figure 3C). The 4 amino-hippurate and lysine metabolites showed a significantly higher concentration only in the W group when compared with C group ( $P=0.0167$ ;  $P=0.0331$ , respectively, Figures 3A and 3E), but in the maternal leucine supplemented group (WL) no differences were found. In relation to metabolites impacted in the tumour-bearing groups, the metabolic pathways that could be related to these changes were: pyrimidine metabolism, aminoacyl-tRNA

biosynthesis, D-glutamine and D-glutamate metabolism, biotin metabolism, and nitrogen metabolism (*MetaboAnalyst* (XIA et al, 2015)), which were related to energy and nutrients disposable to tumour growth and deficient availability to host function.



**Figure 2.** Serum PLS-DA score plot; Accuracy test of serum sample spectra and Serum VIP scores and metabolites identified. Legend: C, Control group (n = 5, red); W, Tumour-bearing animals (n = 5; dark blue); L, Group without tumour and with a maternal leucine-rich diet; (n = 6, green); WL, Tumour-bearing group with a maternal leucine-rich diet (n = 6; light blue s).



**Figure 3.** Serum metabolites normalised concentrations in  $\mu\text{M}$  among the different experimental groups. Legend: C, Control group (n = 5); W, Tumour-bearing group (n = 5); L, Leucine Control group (n = 6); WL, Tumour Leucine group (n = 6), obtained after Chenomx Profiler in comparison with TSP control. a,  $P < 0.05$  for statistical difference compared to C group, c,  $P < 0.05$  for statistical difference compared to L group.

#### 4. Discussion

The metabolomics analysis provided a view of the clear differentiation of the experimental groups, showing differences in the metabolism of the tumour bearing rats (W) compared to the control group and more interestingly compared to the groups (WL and L) which received the maternal influence by the leucine-rich diet. Thus, even in the short period of gestation (21 days) and lactation (21 days), the maternal supplementation was capable of modulating the metabolic responses in the adult offspring (120 days above). These differences may be related to the preventive benefits of this diet, showed in our previous studies (Thesis Chapter I and II).

Elevated levels of uracil, a precursor of ribonucleic acid, could be related with the rapid growth and cell proliferation of the cancer cells, as presented here with a higher concentration of this metabolite in the tumour bearing groups serum. Corroborating this finding, metabolomics studies with gastric cancer patients with tissue, serum or urinary

samples, presenting the potential of this metabolite as a biomarker of this disease, showed elevated levels of uracil (JIANG et al., 2010; MONDUL et al., 2016; WANG et al., 2016). Also impaired in high rates of cell division situations, as cancer, the ribonucleic acid (RNA) metabolism increases and high concentration of nucleosides, as cytidine, the primary constituents of the RNA, reflect this impairment, being studied as a potential cancer biomarker (FRICKENSCHMIDT et al., 2008; LO et al., 2014). In accordance with these studies, we found an increase of this metabolite in both tumour bearing groups, but no differences were found in the tumour weight (Thesis Chapter II).

The amino acids concentrations reflect the metabolism impairment in cancer cachexia (QUANJUN et al., 2013). The essential amino acids leucine and valine are important regulators of protein synthesis of muscle proteins being an important nitrogen source for glutamine and alanine synthesis and decrease in levels of these BCAAs are associated with the muscle protein catabolism (QUAN-JUN et al., 2015; WU, 2009). Thus, the low levels of glutamine found in this study could be related to the decrease in the BCCA availability and the glutamine hypermetabolism in tumour bearing groups once this amino acid is a preferred fuel for rapidly dividing cells, and also an essential source of reduced nitrogen for biosynthetic reactions, source of carbon to tricarboxylic acid cycle (TCA), being a precursor to produce glutathione, a precursor to nucleotides and lipids synthesis. As presented, in relation to glutamine as basic precursor to antioxidant defences (MATÉS et al., 2002), corroborating this, the impacted metabolic via D-glutamine and D-glutamate metabolism and nitrogen metabolism could reinforce the lower antioxidant response observed in the tumour bearing animals, which, in our previous study, had similar content of glutathione-S-reductase associated to higher increased of lipid peroxidation and despite of the tumour growth, the adult-offspring tumour-bearing rat under maternal leucine diet presented a better antioxidant defence (MIYAGUTI; DE OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2018). Moreover, the reduced serum content of glutamine could be related to the intense neoplastic cells energy demands leading to a cachectic state. This increased level probably is related to the high levels of uracil and cytidine in the tumour-bearing groups, but as mentioned before no difference was found in the tumour size of maternal supplemented leucine group (WL) (Thesis Chapter II). In accordance with these points, high levels of lysine can also be related to the increased protein breakdown in cancer cachexia and are increased in biofluids in patients with cancer (GISKEØDEGÅRD et al., 2018). Study of Peters and colleagues showed the role of L-leucine to preserve muscle mass loss in cancer cachectic mice (PETERS et al., 2011), showing that, the C26 tumour bearing group exhibited an increased protein breakdown

and high levels of serum amino acids, including lysine, and under treatment the leucine supplemented group could attenuate the increase in total plasma amino acids reflecting an lower muscle mass spoliation (PETERS et al., 2011). In accordance with Peters and colleagues study, here we presented that the tumour bearing group (W) showed an increase in lysine concentration, consistently with our previous results which this group W had increased protein breakdown, associated with low protein synthesis (Thesis Chapter II). This could lead to a higher release of serum amino acids, including lysine, which is highly concentrated in skeletal muscle compared to most other amino acids. On the other hand, we observed that the maternal leucine supplementation could modulate the lysine plasma concentration, showing the preventive role of the maternal diet and being probably related to the lower muscle mass loss. Besides lysine modulation, the leucine-rich diet also modified the 4 amino-hippurate, a metabolite of phenylalanine and also related to metabolism of fatty acids, which was already found to be increased in cancer patients biofluids (GISKEØDEGÅRD et al., 2018). Phenylalanine is related to the energy metabolism and also with protein synthesis, but the correlation between the higher levels the 4-amino-hippurate in tumour-bearing animals still lack investigation. Another view of the metabolic pathway changed in tumour-bearing animals, the increased level of 4-amino-hippurate could be likely related to that disorders with mitochondrial fatty acid beta-oxidation, which could reinforce the lack of energy disposable to the host functions. Previous studies showed evidences that the cachexia induces damages in muscle mitochondrial function and activity (BROWN et al., 2017; MARZETTI et al., 2017; VAN DER ENDE et al., 2018). Here in the present study, we have verified that the maternal diet supplementation with leucine modulated the metabolite 4-amino-hippurate in WL group, which could be linked to improving the energy production and availability to muscle tissue, causing the lower muscle wasting as verified in this group.

This study provided important information about the impaired metabolism of the Walker- 256 tumour bearing animals and the capacity of the leucine-rich diet when maternally administrated in modification of this metabolism. These data allow investigating the possible mechanisms that culminate in these metabolic changes and associate with the benefits presented by this diet in ameliorating the muscle mass loss and liver responses to cachexia. The limitation of this study was the low number of animals/samples once this type of metabolomics study reacquires a large minimal number of animals per group to be able to analyses the differentiation between each two groups. Studies in our laboratory are focusing in the epigenetic mechanisms provided by the maternal diet supplementation which could prevent the cancer-cachexia damages in the tumour bearing adult offspring.



## **Declarations**

### *Funding*

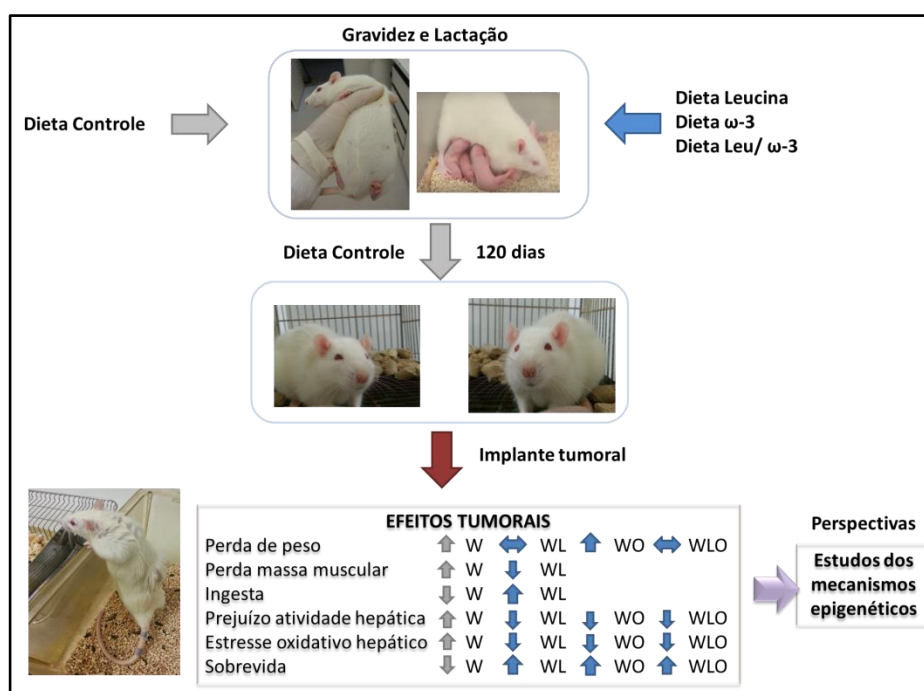
The research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), grant number #2014/13334-7, # 2017/10809-2, #2017/02739-4; Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), grant number #302524/2016-9 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 001.

### *Acknowledgements*

The authors acknowledge Dr. Maurício Luís S Força for his help with NMR methodology and data acquisition; Rafael Rossi Valentim and Carla de Moraes Salgado for they help with NMR data acquisition. L-leucine was donated by Ajinomoto Brazil (Sao Paulo, Brazil).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentado em três capítulos ressaltou o papel do aminoácido de cadeia ramificada leucina e o óleo de fígado de bacalhau, rico em ômega-3 (com destaque para o EPA e DHA,) como possíveis formas de prevenção aos efeitos deletérios da caquexia associada ao câncer quando administrados através da suplementação da dieta materna, durante a gestação e lactação, trazendo benefícios que podem prevalecer até a vida adulta da prole. Foi demonstrada a capacidade desta suplementação materna em modular o metabolismo da prole adulta de ratos, apresentando melhorias tanto da função hepática e resposta antioxidante neste órgão, quanto à diminuição da espoliação muscular, melhorando as respostas contra os efeitos deletérios da caquexia (Esquema 1). Ao final, o presente trabalho trouxe dados e abordagens inovadoras, abrindo espaço para a avaliação das alterações epigenéticas que culminaram em tais benefícios verificados na prole adulta.



Esquema 1. Influência da suplementação nutricional da dieta materna sobre os efeitos deletérios do crescimento do tumor de Walker 256, na prole adulta e perspectivas para o futuro.

## 5. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S.; DHIMAN, R. K.; LIMDI, J. K. Evaluation of abnormal liver function tests. p. 223–234, 2016.
- ALBERT, B. B. et al. Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. **Scientific reports**, v. 5, p. 7928, 2015.
- ANTHONY, J. C. et al. Symposium: Leucine as a Nutritional Signal Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine 1. p. 856–860, 2001.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–62, 9 out. 2014.
- ARGILÉS, J. M. et al. Novel targeted therapies for cancer cachexia. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 16, p. 2663–2678, 2017.
- ARGILÉS, J. M. et al. Inter-tissue communication in cancer cachexia. **Nature Reviews Endocrinology**, 2018.
- BAIL, J.; MENESES, K.; DEMARK-WAHNEFRIED, W. Nutritional Status and Diet in Cancer Prevention. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 32, n. 3, p. 206–214, 2016.
- BAKER, D. E. J. Reproduction and breeding. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. (Eds.). . **The Laboratory Rat**. 1. ed. New York: Academic Press, 1979. p. 153–168.
- BALDWIN, C. The effectiveness of nutritional interventions in malnutrition and cachexia. **Proceedings of the Nutrition Society**, n. December 2014, p. 1–8, 2015.
- BALSTAD, T. R. et al. Dietary treatment of weight loss in patients with advanced cancer and cachexia: A systematic literature review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 91, n. 2, p. 210–221, 2014.
- BARACOS, V. E. et al. Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–18, 2018.
- BARBER, M. D. Cancer cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, v. 17, n. 9, p. 751–755, set. 2001.
- BARRETT, A. J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. **The Biochemical journal**, v. 187, n. 3, p. 909–912, 1980.
- BECK, S. A.; SMITH, K. L.; TISDALE, M. J. Anticachectic and Antitumor Effect of Eicosapentaenoic Acid and Its Effect on Protein Turnover Anticachectic and Antitumor Effect of Eicosapentaenoic Protein Turnover1. **Cancer Research**, p. 6089–6093, 1991.

BELO, S. R. B. et al. Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: A response linked by the increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 30, n. 11, p. 770–776, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BROWN, J. L. et al. Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 6, p. 926–938, 2017.

BUROKER-KILGORE, M.; WANG, K. K. W. A coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases **Analytical Biochemistry**, 1993.

BUSQUETS, S. et al. Omega - 3 and omega - 3 / curcumin - enriched fruit juices decrease tumour growth and reduce muscle wasting in tumour - bearing mice. **Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle- Rapid Communications**, 2018.

CALA, M. P. et al. Multiplatform plasma fingerprinting in cancer cachexia: a pilot observational and translational study. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 2, p. 348–357, 2018.

CALDER, P. C. et al. Targeted medical nutrition for cachexia in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled trial. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 1, p. 28–40, 2018.

CHOUDRY, H. A. et al. Branched-Chain Amino Acids : Metabolism , Physiological Function , and Application. **American Society for Nutrition**, p. 314–318, 2006.

**CID10 Código Internacional de Doenças**. Disponível em: <[www.cid10.com.br/](http://www.cid10.com.br/)>. Acesso em: 6 jun. 2019.

COHEN, G.; DEMBIEC, D.; MARCUS, J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Analytical biochemistry**, v. 34, p. 30–8, mar. 1970.

COSTELLI, P. et al. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in muscle wasting. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 10 SPEC. ISS., p. 2134–2146, 2005.

CRUZ, B.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 2, jan. 2014.

CRUZ, B. L. G. et al. Dietary leucine supplementation minimises tumour-induced

damage in placental tissues of pregnant, tumour-bearing rats. **BMC cancer**, v. 16, p. 58, 4 fev. 2016.

CRUZ, B.; OLIVEIRA, A.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. L-leucine dietary supplementation modulates muscle protein degradation and increases pro-inflammatory cytokines in tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 96, n. April, p. 253–260, 2017.

CURI, R.; FERNANDES, L. C. Glucose metabolism by lymphocytes , macrophages , and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation. **Cell Biochemistry and Function**, n. August, p. 874–880, 2008.

D.H., J. et al. Eicosapentaenoic acid supplementation reduces tumor volume and attenuates cachexia in a rat model of progressive non-metastasizing malignancy. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 291–297, 2002.

DAMSBO-SVENDSEN, S.; RØNSHOLDT, M. D.; LAURITZEN, L. Fish oil-supplementation increases appetite in healthy adults. A randomized controlled cross-over trial. **Appetite**, v. 66, p. 62–66, 2013.

DANIEL A COLUMBUS, MARTA L FIOROTTO, AND T. A. D. Leucine is a major regulator of muscle protein synthesis in neonates. **Amino Acids**, v. 47, n. 2, p. 259–270, 2015.

DE AGUIAR PASTORE SILVA, J.; EMILIA DE SOUZA FABRE, M.; WAITZBERG, D. L. Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 359–366, 2015.

DE FRANCESCHI, I. D. et al. Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 3, p. 632–643, 2013.

DEMINICE, R. et al. Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 2015–2024, 2016.

DER-TOROSSIEN, H. et al. Cancer cachexia's metabolic signature in a murine model confirms a distinct entity. **Metabolomics**, v. 9, n. 3, p. 730–739, 2013a.

DER-TOROSSIEN, H. et al. Metabolic derangements in the gastrocnemius and the effect of Compound A therapy in a murine model of cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 2, p. 145–155, 2013b.

DIETERLE, F. et al. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in <sup>1</sup>H NMR metabonomics.

**Analytical Chemistry**, v. 78, n. 13, p. 4281–4290, 2006.

DUAN, Y. et al. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. **Amino Acids**, v. 48, n. 1, p. 41–51, 2016.

EISNER, R. et al. Learning to predict cancer-associated skeletal muscle wasting from <sup>1</sup>H-NMR profiles of urinary metabolites. **Metabolomics**, v. 7, n. 1, p. 25–34, 2011.

ELEY, H. L.; TISDALE, M. J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7087–97, 9 mar. 2007.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011a.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011b.

FEARON, K. C. H. et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentaenoic acid diester in patients with cancer cachexia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 21, p. 3401–3407, 2006.

FEARON, K. C. H.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153–166, 2012.

FEARON, K. C.; VOSS, A. C.; HUSTEAD, D. S. Definition of cancer cachexia: Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1345–1350, 2006.

FLABOURARIS, G.; KARIKAS, G. A. Nutri-epigenetics and synthetic analogs in cancer chemoprevention. **Journal of B.U.ON.**, v. 21, n. 1, p. 4–16, 2016.

FLINT, T. R.; FEARON, D. T.; JANOWITZ, T. Connecting the Metabolic and Immune Responses to Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 451–464, 2017.

FRICKENSCHMIDT, A. et al. Metabonomics in cancer diagnosis: mass spectrometry-based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients. **Biomarkers**, v. 13, n. June, p. 435–449, 2008.

GAD, S. C.; WEIL, C. S. **Statistics for toxicologists**. In: WALLAC ed. New York: Principles and Methods of Toxicology, 1994.

GALLAGHER, I. J. et al. Omics/systems biology and cancer cachexia. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 54, p. 92–103, 2016.

GARLICK PETER. The Role of Leucine in the Regulation of Protein Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 6, p. 1553S-1556S, 2005.

GIRÓN, M. D. et al.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-

induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–20, 2015.

GISKEØDEGÅRD, G. F. et al. NMR-based metabolomics of biofluids in cancer. **NMR in Biomedicine**, n. March, p. e3927, 2018.

GLUCKMAN, P. D. et al. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 272, n. 1564, p. 671–7, 7 abr. 2005.

GOMES-MARCONDES, M. C. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Letters**, v. 180, n. 1, p. 69–74, 2002.

GONÇALVES, E. M.; SALOMÃO, E. M.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine modulates the effect of Walker factor, a proteolysis-inducing factor-like protein from Walker tumours, on gene expression and cellular activity in C2C12 myotubes. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 343–350, 2013.

GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor. **Muscle and Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950–958, 2010.

H.L., S. . B.; J.R, L.; WEIBROTH. Reproduction and Breeding. In: **Laboratory Rat**. Volume 1 ed. New York: Academic Press, 1991. p. 153–168.

HAJJAJI, N. et al. DHA effect on chemotherapy-induced body weight loss: an exploratory study in a rodent model of mammary tumors. **Nutrition and cancer**, v. 64, n. 7, p. 1000–7, jan. 2012.

HAN, J. M. et al. Leucyl-tRNA Synthetase Is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 410–424, 2012.

HARLE, L. et al. Omega-3 Fatty Acids for the Treatment of Cancer Cachexia: Issues in Designing Clinical Trials of Dietary Supplements. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1039–1046, dez. 2005.

HOLEČEK, M. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation and skeletal muscle in healthy and muscle-wasting conditions. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 4, p. 529–541, 2017.

HOLLAND, M. L. et al. Early-life nutrition modulates the epigenetic state of specific rDNA genetic variants in mice. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 495–498, 29 jul. 2016.

HSU, C. et al. Maternal Administration of Probiotic or Prebiotic Prevents Male Adult Rat Offspring against Developmental Programming of Hypertension Induced by High

Fructose Consumption in Pregnancy and Lactation. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1229, 2018.

IAGHER, F. et al. Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 146, 2013.

INCA. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

JACK-ROBERTS, C. et al. Choline supplementation normalizes fetal adiposity and reduces lipogenic gene expression in a mouse model of maternal obesity. **Nutrients**, v. 9, n. 8, 2017.

JAKOBY, W. H. H. M. J. P. W. B. Glutathione S- Transferases - The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

JIANG, Y. et al. Quantitative Determination of Sarcosine and Related Compounds in Urinary Samples by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 21, p. 9022–9027, 2010.

KATO, T. et al. Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice. **Cancer Letters**, v. 187, n. 1–2, p. 169–177, 2002.

KATSANOS, C. S. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 2, p. E381–E387, 2006.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling Pathways and Molecular Mechanisms through which Branched-Chain Amino Acids Mediate Translational Control of Protein Synthesis. **American Society for Nutrition**, n. 6, p. 227–231, 2006.

KOOPMAN, R. et al. Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 3, p. 623–632, 2006.

KOSMIDES, K. K. S. E. C. S. A. C. I. P. A. . A. K. Metabolomic Fingerprinting : Challenges and Opportunities. **Crit Rev Biomed Eng.**, v. 41, n. 3, p. 205–221, 2014.

LARSSON, S. C. et al. Dietary long-chain n- 3 fatty acids for the prevention of cancer : a review of potential mechanisms 1 – 3. **The American journal of clinical nutrition**, 2004.

LAVIANO, A.; RIANDA, S.; MOLFINO, A. Omega-3 fatty acids in cancer. v. 16, n. 2, p. 156–161, 2013.

LECKER, S. H. et al. Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin- Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **The Journal of Nutrition**, v.



129, p. 227–237, 1999.

LEE, H. S. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9492–9507, 2015.

LINDSEY HARLE, B.S.; TODD BROWN, M.D.; DANIEL LAHERU, M.D.; ADRIAN S. DOBS, M. D. . M. H. S. Omega-3 Fatty Acids for the Treatment of Cancer Cachexia : Issues in Designing Clinical Trials of Dietary Supplements. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1039–1046, 2005.

LIU, Z. et al. Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and New Concept : A Review. v. 11, 2014.

LO, W. et al. Urinary cytidine as an adjunct biomarker to improve the diagnostic ratio for gastric cancer in Taiwanese patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 428, p. 57–62, 2014.

LORITE, M. J. et al. Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. **Br. J. Cancer**, v. 78, p. 850–856, 1998.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MABASA, L. et al. Maternal dietary canola oil suppresses growth of mammary carcinogenesis in female rat offspring. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 5, p. 695–701, 2013.

MARTINS, M. J.; NEGRÃO, M. R.; HIPÓLITO-REIS, C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 463–468, 2001a.

MARTINS, M. J.; NEGRÃO, M. R.; HIPÓLITO-REIS, C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clinical biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 463–8, set. 2001b.

MARZETTI, E. et al. Altered mitochondrial quality control signaling in muscle of old gastric cancer patients with cachexia. **Experimental Gerontology**, v. 87, p. 92–99, 2017.

MATÉS, J. M. et al. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, n. 5, p. 439–458, 2002.

MATHIAS, P. C. F. et al. **Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming** *European Journal of Nutrition*, 2014.

MAYNE, S. T.; PLAYDON, M. C.; ROCK, C. L. Diet, nutrition, and cancer: Past, present and future. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 8, p. 504–515, 2016.

MELNIK, B. C. Milk — A Nutrient System of Mammalian Evolution Promoting

mTORC1-Dependent Translation. p. 17048–17087, 2015.

MENNITTI, L. V et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and / or lactation and metabolic consequences of the offspring. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 99–111, 2015.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271–278, 1978.

MILAN, G. et al. Regulation of autophagy and the ubiquitin – network during muscle atrophy. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–14, 2015.

MIYAGUTI, N. A. DA S.; DE OLIVEIRA, S. C. P.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Maternal nutritional supplementation with fish oil and/or leucine improves hepatic function and antioxidant defenses, and minimizes cachexia indexes in Walker-256 tumor-bearing rats offspring. **Nutrition Research**, v. 51, p. 29–39, 2018.

MONDUL, A. M. et al. Metabolomic analysis of prostate cancer risk in a prospective cohort: The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study. **International journal of cancer**, v. 2132, n. May 2015, p. 2124–2132, 2016.

MORRIS-STIFF, G.; GOMEZ, D.; PRASAD, K. R. C-reactive protein in liver cancer surgery. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 34, n. 7, p. 727–729, 2008.

MUELLER, T. C. et al. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia--can findings from animal models be translated to humans? **BMC cancer**, v. 16, p. 75, 2015.

MURPHY, R. A et al. Influence of eicosapentaenoic acid supplementation on lean body mass in cancer cachexia. **British journal of cancer**, v. 105, n. 10, p. 1469–73, 8 nov. 2011.

NABAVI, S. F. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer: lessons learned from clinical trials. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 3, p. 359–380, 2015.

OH, D. Y. et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2010.

OLIVEIRA, A. G.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Metformin treatment modulates the tumour-induced wasting effects in muscle protein metabolism minimising the cachexia in tumour-bearing rats. **BMC cancer**, v. 16, p. 418, 7 jul. 2016.

OMS. WHO- Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

OP DEN KAMP, C. M. et al. Nuclear transcription factor  $\kappa$  B activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer

cachexia. **Am J Clin Nutr**, n. 1, p. 738–748, 2013.

ORINO, E. et al. ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. **FEBS Letters**, v. 284, n. 2, p. 206–210, 1991.

PAPPALARDO, G.; ALMEIDA, A.; RAVASCO, P. Eicosapentaenoic acid in cancer improves body composition and modulates metabolism. **Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 549–555, 2015.

PERERA, F.; HERBSTMAN, J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 363–373, 2011.

PETERS, S. J. et al. Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice. **Oncology reports**, v. 26, n. 1, p. 247–54, jul. 2011.

PEYTA, L. et al. Regulation of hepatic cardiolipin metabolism by TNF $\alpha$ : Implication in cancer cachexia. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 11, p. 1490–1500, 2015.

PIZATO, N. et al. Ratio of n6 to n-3 Fatty Acids in the Diet Affects Tumor Growth and Cachexia in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 194–201, 2005.

POON, R. T.-P. et al. Long-term oral branched chain amino acids in patients undergoing chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized trial. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 7, p. 779–788, 2004.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e200, 2016.

QUAN-JUN, Y. et al. NMR-based metabolomics reveals distinct pathways mediated by curcumin in cachexia mice bearing CT26 tumor. **RSC Advances**, v. 5, n. 16, p. 11766–11775, 2015.

QUANJUN, Y. et al. Serum metabolic profiles reveal the effect of formoterol on cachexia in tumor-bearing mice. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 12, p. 3015–3025, 2013.

QUANJUN, Y. et al. Integrated analysis of serum and intact muscle metabonomics identify metabolic profiles of cancer cachexia in a dynamic mouse model. **RSC Advances**, v. 5, n. 112, p. 92438–92448, 2015.

REEVES, P. G. Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents : Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. p. 1939–1951, 1993.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–51, nov. 1993.

REGNAULT, T. R. H.; VRIJER, B. DE; BATTAGLIA, F. C. Transport and Metabolism of Amino Acids in Placenta. v. 19, n. 1, p. 23–41, 2002.

REMELY, M. et al. Nutriepigenomics. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 4, p. 328–333, 2015.

SALOMÃO, E. M. et al. Physical Exercise and a Leucine-Rich Diet Modulate the Muscle Protein Metabolism in Walker Tumor-Bearing Rats. n. August 2011, p. 37–41, 2010.

SAPIENZA, C.; ISSA, J.-P. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. **Annual Review of Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 665–681, 2016.

SATO, K. et al. Hydroxyl radical production by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus Cu,Zn-superoxide dismutase reflects the activity of free copper released from the oxidatively damaged enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 35, p. 25371–25377, 1992.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017.

SCHIESSEL, D. L. et al.  $\alpha$ -Linolenic Fatty Acid Supplementation Decreases Tumor Growth and Cachexia Parameters in Walker 256 Tumor-Bearing Rats  $\alpha$ -Linolenic Fatty Acid Supplementation Decreases Tumor Growth and Cachexia Parameters in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Nutrition and cancer**, v. 5581, n. April 2016, 2015.

SMITH, H. J.; MUKERJI, P.; TISDALE, M. J. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. **Cancer research**, v. 65, n. 1, p. 277–83, jan. 2005.

SMITH, I. J. et al. CALPAIN activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. **Muscle & Nerve**, v. 43, n. 3, p. 410–414, mar. 2011.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

STEPHENS, N. A. et al. Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia. p. 1–12, 2010.

SUDHAN, D. R.; SIEMANN, D. W. Cathepsin L targeting in cancer treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 155, p. 105–16, nov. 2015.

TAMASHIRO, K. L. K.; MORAN, T. H. Perinatal environment and its influences on

metabolic programming of offspring. **Physiology & behavior**, v. 100, n. 5, p. 560–6, 14 jul. 2010.

TAMMEN, S. A.; FRISO, S.; CHOI, S. W. Epigenetics: The link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 753–764, 2013.

TARDIF, N. et al. Autophagic-Lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients1-3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1485–1492, 2013.

THANIKACHALAM, K. et al. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients** **2019**, Vol. **11**, Page **164**, v. 11, n. 1, p. 164, 2019.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438–442, maio 2001.

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 11, p. 862–871, nov. 2002a.

TISDALE, M. J. Cachexia in Cancer Patients. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 11, p. 883–9, nov. 2002b.

TISDALE, M. J. Pathogenesis of Cancer Cachexia. **J Support Oncol**, v. 1, p. 159–168, 2003.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, abr. 2009.

TISDALE, M. J. Reversing cachexia. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 511–2, 20 ago. 2010.

TOLEDO, M. T.; VENTRUCCI, G.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Increased oxidative stress in the placenta tissue and cell culture of tumour-bearing pregnant rats. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 859–864, 2011.

TONETO, A. T. et al. Nutritional leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumour-bearing cachectic animals. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 7, n. 5, p. 577–586, dez. 2016.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469–479, 2007.

TSUCHIDA, S.; SATO, K. Glutathione Transferases and Cancer. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4–5, p. 337–384, jan. 1992.

UKCCC. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research. **Anais...**1998

VALE, C.; STEWART, L.; TIERNEY, J. Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. **British**

**journal of cancer**, v. 92, n. 5, p. 811–4, 14 mar. 2005.

VAN DER ENDE, M. et al. Mitochondrial dynamics in cancer-induced cachexia. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1870, n. 2, p. 137–150, 2018.

VANDEN BERGHE, W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 65, n. 6, p. 565–76, jun. 2012.

VAUGHAN, V. C.; HASSING, M.; LEWANDOWSKI, P. A. Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. **British Journal of Cancer**, n. November 2012, p. 1–7, 2013.

VENTRUCI, G.; MELLO, M. A. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **BMC cancer**, v. 7, p. 42, jan. 2007.

VENTRUCI, G.; MELLO, M. A. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, n. 4, p. 887–895, 2004.

VERMA, M. Cancer control and prevention: Nutrition and epigenetics. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 4, p. 376–384, 2013.

VIANA, L. R. et al. Leucine-rich diet alters the (1)H-NMR based metabolomic profile without changing the Walker-256 tumour mass in rats. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 764, 3 out. 2016.

VIANA, L. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine-Rich Diet Improves the Serum Amino Acid Profile and Body Composition of Fetuses from Tumor-Bearing Pregnant Mice1. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 1–8, 2013.

WAALKES, T. P.; UDENFRIEND, S. A. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 50, p. 733–736, 1957.

WANG, H. et al. Tissue metabolic profiling of human gastric cancer assessed by1H NMR. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016.

WEED, H. G. et al. Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. **Head and Neck**, v. 33, n. 07, p. 1027–1033, 2011.

WHITEHOUSE, A. S. et al. Mechanism of Attenuation of Skeletal Muscle Protein Catabolism in Cancer Cachexia by Eicosapentaenoic Acid 1. **Cancer Research**, p. 3604–3609, 2001.

WHITFIELD, J. B. Gamma Glutamyl Transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 38, n. 4, p. 263–355, 2001.

WINTERBOURN, C. C. et al. The estimation of red cell superoxide dismutase

activity. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 85, n. 2, p. 337–41, fev. 1975.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, p. 1–17, 2009.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 2015.

YUCHUNG, C. et al. Long-term oral administration of branched chain amino acids after curative resection of hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. **British Journal of Surgery**, v. 84, n. 11, p. 1525–1531, 1997.

## 6. ANEXOS



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Efeitos da suplementação nutricional com leucina e/ou ácido graxo poli-insaturado ômega-3 na modulação dos efeitos do câncer na prole de ratas, registrada com o nº **4224-1**, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e Natália Miyaguti Angelo Da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 01 de julho de 2016.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2016-31/12/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/07/2016-31/12/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Rato Heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	44
Peso / Idade:	90 dias / 350g
Sexo:	20 machos 20 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

**IMPORANTE:** Serão usados 48 machos provenientes dos cruzamentos.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 01 de julho de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA E/OU ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS DO CÂNCER NA PROLE DE RATAS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 1 de julho de 2019.

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Natália Miyaguti Angelo da Silva**  
RG n.º 45969101-6

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes**  
RG n.º 10153517